



**Universidad
Zaragoza**



**Escuela Politécnica
Superior - Huesca
Universidad Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Conservación *in vitro* de una colección de especies
frutales en condiciones de crecimiento lento

Autor

M^a Pilar Lorente Alonso

Directores

M^a Pilar Andreu Puyal
Arancha Arbeloa Matute
Juan A. Marín Velázquez

Escuela Politécnica Superior de Huesca
Diciembre 2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) por haberme dado la oportunidad de realizar el presente proyecto, poniendo a mi disposición todos los medios y materiales necesarios para su realización

En primer lugar quiero agradecer a la Doctora Pilar Andreu, a la Doctora Arancha Arbeloa y al Doctor Juan A. Marín por haber dirigido éste proyecto, por la colaboración prestada y por poner a mi alcance sus conocimientos científicos, además de su incondicional ayuda y apoyo, y su confianza depositada en mí y darme esta oportunidad.

Agradecer a mi tutor de la Universidad Politécnica de Huesca, D. Ramón Reiné, la atención prestada en todo momento.

También a Elena García, por sus inestimables consejos y su apoyo incondicional, una gran compañera y amiga.

Agradecer al personal de la Estación Experimental de Aula Dei por su simpatía y preocupación por mí.

Con todo mi corazón, dedicárselo a mis padres, Aurelio y María, a mis familiares y amigos por su comprensión, cariño y apoyo recibido. Deseo expresar la incondicional ayuda en todo momento de Bea, que siempre está ahí, 'You are the best'.

ÍNDICE

Índice	I
Índice de Tablas	II
Índice de Figuras	III
RESUMEN	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA	23
1.2. EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN LA CONSERVACIÓN DEL GERMOPLASMA	25
1.2.1. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	26
1.2.2. CRECIMIENTO RALENTIZADO	28
1.2.3. CRIOCONSERVACIÓN	30
1.3. LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA FRUTAL.....	32
1.3.1. COLECCIONES EN CAMPO.....	32
1.3.2. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i>	33
1.3.3. FRUTALES PARA LA CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO LENTO	35
1.4. JUSTIFICACIÓN	46
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAL Y MÉTODOS	55
3.1. MATERIAL VEGETAL	55
3.2. MICROPROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	57
3.2.1. ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	60
3.3. EL CULTIVO EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO LENTO	61
3.3.1. TRATAMIENTO 1: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses con luz continua.....	62

3.3.2. TRATAMIENTO 2: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses en oscuridad.....	63
3.3.3. TRATAMIENTO 3: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 7 meses en oscuridad.....	63
3.3.4. TRATAMIENTO 4: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 12 meses en oscuridad.....	63
3.3.5. RECUPERACIÓN DEL MATERIAL DESPUÉS DE LA CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO LENTO	64
3.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	64
3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	65
4. RESULTADOS	69
4.1. TRATAMIENTO 1: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses con luz continua.....	69
4.2. TRATAMIENTO 2: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses en oscuridad.	69
4.2.1. Género <i>Prunus</i>	70
4.2.2. Género <i>Malus</i> : <i>Malus domestica</i> (2 clones).	82
4.2.3. Género <i>Pyrus</i> : <i>Pyrus communis</i> (1 clon).....	83
4.2.4. Género <i>Ficus</i> : <i>Ficus carica</i> (2 clones).	84
4.2.5. Género <i>Punica</i> : <i>Punica granatum</i> (1 clon).	84
4.2.6. Género <i>Cydonia</i> : <i>Cydonia oblonga</i> (2 clones).....	84
4.2.7. Género <i>Eriobotrya</i> : <i>Eriobotrya japonica</i> (2 clones).	85
4.2.8. Género <i>Crataegus</i> : <i>Crataegus monogyna</i> (3 clones).	86
4.3. TRATAMIENTO 3: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 7 meses en oscuridad.....	87
4.3.1. Género <i>Prunus</i>	87
4.3.2. Género <i>Malus</i> : <i>Malus domestica</i> (2 clones).	101
4.3.3. Género <i>Pyrus</i> : <i>Pyrus communis</i> (1 clon).....	101
4.3.4. Género <i>Ficus</i> : <i>Ficus carica</i> (2 clones).	102

4.3.5. Género <i>Punica</i> : <i>Punica granatum</i> (1 clon).	102
4.3.6. Género <i>Cydonia</i> : <i>Cydonia oblonga</i> (2 clones).	102
4.3.7. Género <i>Eriobotrya</i> : <i>Eriobotrya japonica</i> (2 clones).	103
4.3.8. Género <i>Crataegus</i> : <i>Crataegus monogyna</i> (3 clones).	104
4.4. TRATAMIENTO 4: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 12 meses en oscuridad.	105
4.4.1. Género <i>Prunus</i>	105
4.4.2. Género <i>Malus</i> : <i>Malus domestica</i> (2 clones).	117
4.4.3. Género <i>Pyrus</i> : <i>Pyrus communis</i> (1 clon).	118
4.4.4. Género <i>Ficus</i> : <i>Ficus carica</i> (2 clones).	119
4.4.5. Género <i>Punica</i> : <i>Punica granatum</i> (1 clon).	119
4.4.6. Género <i>Cydonia</i> : <i>Cydonia oblonga</i> (2 clones).	119
4.4.7. Género <i>Eriobotrya</i> : <i>Eriobotrya japonica</i> (2 clones).	120
4.4.8. Género <i>Crataegus</i> : <i>Crataegus monogyna</i> (3 clones).	121
4.5. EFECTO LUZ/OSCURIDAD.	122
4.6. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO	123
4.7. EFECTO TIEMPO	134
4.8. RECUPERACIÓN DEL MATERIAL	140
5. DISCUSIÓN	145
6. CONCLUSIONES.	155
7. BIBLIOGRAFÍA.	159

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo MS utilizado en la multiplicación del material expresado en mg/l.....	59
Tabla 2: <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	70
Tabla 3: <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> en el tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	73
Tabla 4: Tabla de Contingencia entre multiplicación y elongación de los brotes de <i>Prunus cerasifera x armeniaca</i> (Tratamiento 2) con el valor de χ^2 y su probabilidad de error <i>p</i>	74
Tabla 5: <i>Prunus domestica</i> en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	76
Tabla 6: <i>Prunus cerasus</i> (Cab) y <i>P. avium x pseudocerasus</i> (Colt) en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	77
Tabla 7: <i>Prunus persica</i> , <i>P. amygdalus x persica</i> y <i>P. persica x davidiana</i> en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	79
Tabla 8: <i>Prunus spinosa</i> en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	81
Tabla 9: <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	88

Tabla 10: <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	90
Tabla 11: Tabla de Contingencia entre multiplicación y elongación de los brotes de <i>Prunus cerasifera x armeniaca</i> (Tratamiento 3) con el valor de χ^2 y su probabilidad de error <i>p</i>	92
Tabla 12: <i>Prunus domestica</i> en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	94
Tabla 13: <i>Prunus cerasus y Prunus avium x pseudocerasus</i> en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	96
Tabla 14: <i>Prunus persica, Prunus amygdalus x persica y Prunus persica x davidiana</i> en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	97
Tabla 15: <i>Prunus spinosa</i> en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	100
Tabla 16: <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	106
Tabla 17: <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	108
Tabla 18: <i>Prunus domestica</i> en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).	111

Tabla 19: *Prunus cerasus* y *Prunus avium* x *P.pseudocerasus* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-)..... 112

Tabla 20: *Prunus persica*, *Prunus amygdalus* x *persica* y *Prunus persica*. x *davidiana* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-). 114

Tabla 21: *Prunus spinosa* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-)..... 116

Tabla 22: Resultados de multiplicación y elongación de los brotes de *Prunus cerasifera* x *armeniaca* en los medios utilizados expresado en porcentaje (Tratamiento 2 y 3). 133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cabina de flujo laminar.....	58
Figura 2: Esterilizador de bolas. Esterilización a 250°C.	58
Figura 3: Cámara de cultivo tipo armario	58
Figura 4: Cámara de cultivo de grandes dimensiones.	58
Figura 5: Elaboración de medio de cultivo	60
Figura 6: Aparato dispensador	60
Figura 7: Autoclave para esterilización	61
Figura 8: Mirobolán P2980 (izquierda) y Mirobolán 605 (derecha) ambos de la especie <i>Prunus cerasifera</i> con tasa de multiplicación mayor de 7 y brotes elongados en el Tratamiento 2.....	71
Figura 9: Tasa de multiplicación de los clones de <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 2.....	71
Figura 10: Mirobolán 743 (izquierda) y Adara (derecha) ambos de la especie <i>Prunus cerasifera</i> con tasa de multiplicación menor de 5 y brotes no elongados en el Tratamiento 2.....	72
Figura 11: Mariana 2624-11 perteneciente a <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> con brotes elongados y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote tras el Tratamiento 2.....	72
Figura 12: Tasa de multiplicación de <i>P. cerasifera x munsoniana</i> en el Tratamiento 2.....	73
Figura 13: Clon número 65 perteneciente a <i>Prunus cerasifera x armeniaca</i> con brotes elongados y tasa de multiplicación menor de 5 brotes por brote después del Tratamiento 2.....	75
Figura 14: Reina Claudia Verde (Ciruelo-1), clon de <i>Prunus domestica</i> , con una tasa de multiplicación mayor que 7 y elongación de los brotes tras el Tratamiento 2. ..	75
Figura 15: Pollizo 25, clon de <i>Prunus insititia</i> con una tasa de multiplicación mayor que 7 y brotes elongados después del Tratamiento 2.....	77
Figura 16: Tasa de multiplicación de <i>Prunus cerasus</i> y <i>P. avium x pseudocerasus</i> en el Tratamiento 2.	78

Figura 17: Cab P (izquierda) y Cab 6P (derecha) ambos clones de <i>Prunus cerasus</i> con una tasa de multiplicación de 7 y brotes elongados después del Tratamiento 2.	78
Figura 18: Nemaguard (<i>Prunus persica x davidiana</i>) (izquierda) con elongación de brotes y Adarcias 0 (<i>Prunus amygdalus x persica</i>) (derecha) sin elongación de brotes, ambos con tasa inferior a 5 en el Tratamiento 2.....	80
Figura 19: Tasas de multiplicación de <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus amygdalus x persica</i> y <i>Prunus persica x davidiana</i> en el Tratamiento 2.....	80
Figura 20: Tasa de multiplicación de <i>Prunus spinosa</i> en el Tratamiento 2.....	82
Figura 21: Endrino 6 (<i>Prunus spinosa</i>) con elongación de brotes y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote en el Tratamiento 2.....	82
Figura 22: Manzano Jork 9 (izquierda) con tasa de multiplicación de 2 y Douce D'Jerba (derecha) con tasa de 4,8. Ambos del género <i>Malus</i> con elongación de los brotes en el Tratamiento 2.	83
Figura 23: Peral perteneciente al género <i>Pyrus</i> con brotes elongados y tasa de multiplicación por debajo de 5 brotes por brote en el Tratamiento 2.	83
Figura 24: Higuera S4 (género <i>Ficus</i>) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación 5 brotes por brote en el Tratamiento 2.	84
Figura 25: Membrillero BA 29 (género <i>Cydonia</i>) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación inferior a 5 brotes por brote tras el Tratamiento 2.	85
Figura 26: Clon 1 de Níspero japonés (género <i>Eriobotrya</i>) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación inferior a 5 brotes por brote en el Tratamiento 2.	86
Figura 27: Género <i>Crataegus</i> con tasa de multiplicación menor de 5 brotes por brote, elongación de los brotes y brotes muertos en el Tratamiento 2.....	86
Figura 28: Mirobolán B (<i>Prunus cerasifera</i>) sin elongación de los brotes y con una tasa de multiplicación por debajo de 5 brotes por brote tras el Tratamiento 3.	88
Figura 29: Mirobolán 743 (izquierda) cuya tasa de multiplicación está entre 5-7 y Mirobolán 605 (derecha) cuya tasa de multiplicación es mayor de 7, ambos con elongación de sus brotes pertenecientes a <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 3.	89
Figura 30: Tasa de multiplicación de <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 3....	89
Figura 31: Tasa de multiplicación <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> en el Tratamiento 3.....	90

Figura 32: Mariana 2624-11 (izquierda) sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación inferior a 5 y Mariana 2624-12 (derecha) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación superior a 5 ambos pertenecientes a <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> tras el Tratamiento 3.....	91
Figura 33: Clon número 72 (izquierda) con brotes elongados y baja tasa de multiplicación y clon 53 (derecha) con brotes elongados y elevada multiplicación, ambos clones de <i>Prunus cerasifera x armeniaca</i> al salir del Tratamiento 3.....	93
Figura 34: Reina Claudia Verde (clon ciruelo-1) de <i>Prunus domestica</i> con elongación de los brotes y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote en el Tratamiento 3.....	95
Figura 35: Pollizo 25 perteneciente a <i>Prunus insititia</i> con elongación de los brotes y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote en el Tratamiento 3.....	95
Figura 36: Tasa de multiplicación de <i>Prunus cerasus</i> y <i>Prunus avium x pseudocerasus</i> en el Tratamiento 3.....	96
Figura 37: Colt perteneciente a <i>Prunus avium x pseudocerasus</i> con elongación de los brotes y tasa de multiplicación superior a 7 brotes por brote en el tratamiento 3.....	97
Figura 38: Tasa de multiplicación de los clones de <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus amygdalus x persica</i> y <i>Prunus persica x davidiana</i> en el Tratamiento 3.....	98
Figura 39: Adarcias 0 (<i>Prunus amygdalus x persica</i>) (izquierda) con tasa superior a 5 y GF 305 (<i>Prunus persica</i>) (derecha) con tasa inferior a 5 brotes por brote, ambos sin elongación de los brotes en el Tratamiento 3.....	99
Figura 40: Endrino 6 perteneciente a <i>Prunus spinosa</i> con elongación de los brotes y multiplicación inferior a 5 brotes por brote en el Tratamiento 3.....	99
Figura 41: Tasa de multiplicación de <i>Prunus spinosa</i> en el Tratamiento 3.....	100
Figura 42: Manzano Jork 9 (izquierda) con tasa de multiplicación 3,8 y Douce D'Jerba (derecha) con tasa 5,2 brotes por brote, ambos del género <i>Malus</i> con elongación de sus brotes en el Tratamiento 3.....	101
Figura 43: Varios brotes de peral (género <i>Pyrus</i>) elongados por encima del tamaño del recipiente de cultivo que lo contenía tras el Tratamiento 3.....	101
Figura 44: Higuera S4 (género <i>Ficus</i>) con tasa de multiplicación 1,4 brotes por brote y sin elongación de los brotes tras el Tratamiento 3.	102

Figura 45: Membrillero EM-C (izquierda) con tasa de multiplicación 3,4 y membrillero BA 29 (derecha) con tasa de multiplicación 1,8 brotes por brote, ambos con elongación de los brotes tras el Tratamiento 3.	103
Figura 46: Níspero japonés 2 (género <i>Eriobotrya</i>) sin elongación de los brotes en el Tratamiento 3	103
Figura 48: Tasa de multiplicación de los clones del género <i>Crataegus</i> en Tratamiento 3.....	104
Figura 49: Mirobolán B (izquierda) sin elongación de sus brotes y Mirobolán 748 (derecha) con elongación de los brotes de <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 4.	106
Figura 50: Tasa de multiplicación de <i>Prunus cerasifera</i> en el Tratamiento 4. .	107
Figura 51: Mariana 2614-11 perteneciente a <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> sin elongación de sus brotes y multiplicación inferior a 5 brotes por brote tras el Tratamiento 4.....	108
Figura 52: Tasa de multiplicación de <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> en Tratamiento 4.....	109
Figura 53: Clon 74 (izquierda) con brotes elongados y alta tasa de multiplicación y clon 72 (derecha) con brotes no elongados y baja tasa de multiplicación, ambos clones pertenecientes a <i>Prunus cerasifera x armeniaca</i> al salir del Tratamiento 4.	110
Figura 54: Reina Claudia Verde (ciruelo-1) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación 11 brotes por brote.	110
Figura 55: Pollizo 25 de la especie <i>Prunus insititia</i> con elongación de los brotes y tasa de multiplicación 8,2 brotes por brote al finalizar el Tratamiento 4.....	112
Figura 56: Cab P perteneciente a <i>Prunus cerasus</i> con elongación de sus brotes y alta tasa de multiplicación (>7 brotes por brote) en el Tratamiento 4.	113
Figura 57: Tasa de multiplicación de <i>Prunus cerasus</i> y <i>Prunus avium x pseudocerasus</i> en el Tratamiento 4.....	113
Figura 58: GF 305 perteneciente a <i>Prunus persica</i> sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación de 1,1 brotes por brote en el Tratamiento 4.	115
Figura 59: Tasa de multiplicación de <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus amygdalus x persica</i> y <i>Prunus persica x davidiana</i> en el Tratamiento 4.....	115

Figura 60: Clon endrino 1 perteneciente a <i>Prunus spinosa</i> sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación inferior a 5 brotes por brote en el Tratamiento 4..	116
Figura 61: Tasa de multiplicación de <i>Prunus spinosa</i> en el Tratamiento 4.....	117
Figura 62: Manzano Douce D'Jerba (género <i>Malus</i>) con elongación de los brotes tras el Tratamiento 4.	118
Figura 63: Peral perteneciente al género <i>Pyrus</i> con algún brote muerto tras el Tratamiento 4.....	118
Figura 64: Higuera S4 perteneciente al género <i>Ficus</i> con tasa de multiplicación menor de 5 brotes por brote y sin elongación de los brotes en el Tratamiento 4.	119
Figura 65: Membrillero EM-C perteneciente al género <i>Cydonia</i> con elongación de los brotes en el Tratamiento 4.	120
Figura 66: Níspero japonés 1 perteneciente al género <i>Eriobotrya</i> sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación 1,75 brotes por brote en el Tratamiento 4..	120
Figura 67: Espino Albar 2 del género <i>Crataegus</i> con elongación de sus brotes y tasa de multiplicación 14 brotes por brote en el Tratamiento 4.....	121
Figura 68: Tasa de multiplicación de los clones del género <i>Crataegus</i> en Tratamiento 4.....	121
Figura 69: Gráfico del porcentaje de supervivencia de los clones según los diferentes tratamientos.	122
Figura 70: Gráfico del porcentaje de supervivencia en los medios de cultivo MS20 y 1/2MS20.....	123
Figura 71: Comparación del porcentaje de supervivencia de los clones en los Tratamientos 2 y 3 según los diferentes géneros.	124
Figura 72: Comparación de la tasa de multiplicación de 7 géneros en los medios de cultivo MS20 y 1/2MS20.....	125
Figura 73: Clon Higuera S4 perteneciente al género <i>Ficus</i> al salir del crecimiento lento de 7 meses, a la izquierda en el medio MS20 y a la derecha en el medio 1/2MS20.	126
Figura 74: Clon Espino Albar 2 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) del género <i>Crataegus</i> al salir del crecimiento lento de 7 meses..	126

Figura 75: Clon Manzano Douce D'Jerba, perteneciente al género <i>Malus</i> , en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) al salir del crecimiento lento de 7 meses.	127
Figura 76: Clon Níspero 1 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) del género <i>Eriobotrya</i> tras el crecimiento lento durante 7 meses.	127
Figura 77: Clon Adara en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de <i>Prunus cerasifera</i> al salir crecimiento lento durante 7 meses.	128
Figura 78: Clon de Mariana 2621-11 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de <i>P. cerasifera x munsoniana</i> tras el crecimiento lento durante 7 meses.	129
Figura 79: Comparación de la tasa de multiplicación de los clones del género <i>Prunus</i> en los medios de cultivo MS20 y 1/2MS20	130
Figura 80: Mirobolán 743 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de la especie <i>Prunus cerasifera</i> en crecimiento lento durante 7 meses.	131
Figura 81: Marian GF-81 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de la especie <i>Prunus cerasifera x munsoniana</i> en crecimiento lento durante 7 meses.	131
Figura 82: Nemaguard en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de la especie <i>Prunus amygdalus x persica</i> en crecimiento lento durante 7 meses.	131
Figura 83: Frecuencias relativas en el medio MS20, respecto a la tasa de multiplicación, de los clones de <i>P. cerasifera x armeniaca</i> que presentan, o no, elongación.	132
Figura 84: Frecuencias relativas en el medio 1/2MS20, respecto a la tasa de multiplicación de clones de <i>P. cerasifera x armeniaca</i> que presentan, o no, elongación.	133
Figura 85: Clon nº 18 (<i>Prunus cerasifera x armeniaca</i>) tras 7 meses en crecimiento lento en el medio MS20 (izquierda) con brotes con baja tasa de multiplicación y no elongados, y en el medio 1/2MS20 (derecha) con brotes con alta tasa de multiplicación y elongados.	134
Figura 86: Brotes en cultivo de clones de 5 géneros en 1/2MS20 después de 12 meses en cultivo ralentizado: Manzano Douce D'Jerba (<i>Malus</i>) (1). Peral (<i>Pyrus</i>) (2).	

Higuera S4 (<i>Ficus</i>) (3). Membrillero BA (<i>Cydonia</i>) (4). Níspero japonés-1 (<i>Eriobotrya</i>) (5).....	135
Figura 87: Comparación de la tasa de multiplicación en 7 géneros en el medio de cultivo 1/2MS20 después de 7 y 12 meses en cultivo lento	136
Figura 88: Comparación de la tasa de multiplicación del género <i>Prunus</i> en el medio de cultivo 1/2MS20 en los periodos de 7 y 12 meses.	137
Figura 92: Estados de desarrollo del Mirobolán 605 de la especie <i>Prunus cerasifera</i> al salir de la conservación en frío tras el Tratamiento 2 (1), el primer subcultivo (2), segundo subcultivo (3) y tercer subcultivo (4) durante la recuperación.	140
Figura 93: Estados de desarrollo del híbrido nº 3 de <i>Prunus cerasifera x armeniaca</i> al salir de la conservación en frío tras el Tratamiento 3 (1), el primer subcultivo de estos clones (2), su recuperación en un segundo subcultivo (3) y en el tercer subcultivo (4).	141
Figura 94: Comparación del porcentaje de clones recuperados y en crecimiento activo tras 3 subcultivos después del cultivo ralentizado en los Tratamientos 2 y 4....	142

RESUMEN

El cultivo *in vitro* se ha confirmado hoy en día como una herramienta que facilita la multiplicación, la conservación y el almacenamiento de recursos genéticos de especies de propagación vegetativa o con semillas recalcitrantes. Las condiciones de crecimiento ralentizado *in vitro* permiten la conservación del material vegetal con una menor incidencia de trabajo y mano de obra. Para el crecimiento en estas condiciones, hay que tener en cuenta factores como baja temperatura, oscuridad, o medios de cultivo adecuados.

El objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de un método general de conservación *in vitro* para una amplia variedad de especies frutales, atendiendo al crecimiento de los cultivos, tanto durante la conservación, como en su recuperación posterior y multiplicación.

Se conservaron 138 clones pertenecientes a 18 especies frutales de 8 géneros diferentes. Los cultivos se mantuvieron en frigorífico a 4°C de temperatura tanto en oscuridad como en luz durante 7 meses en dos medios de cultivo diferentes, MS20 y 1/2MS20 con las sales minerales a la mitad de concentración, controlando el estado de las plantas cada 4 semanas. Además, se comparó el estado de los cultivos tras la permanencia en dos tiempos de conservación de 7 y 12 meses en las condiciones de oscuridad, 4°C y medio de cultivo MS con mitad de sales y 2% de sacarosa.

Se estudió el porcentaje de especies y clones que sobrevivieron después del periodo de crecimiento lento y se evaluó el tiempo necesario para la recuperación posterior del material en medio de cultivo de multiplicación.

El almacenamiento de germoplasma de frutales en crecimiento lento durante un año, según los resultados de este trabajo, es un método viable para mantener grandes colecciones en poco espacio. Este trabajo ha mostrado que el crecimiento ralentizado permite mantener el material vegetal de una manera eficaz, ya que hemos obtenido una supervivencia del 98,6% de los 138 clones estudiados, desarrollando un protocolo generalizado válido para 136 clones de 17 especies pertenecientes a 7 géneros. Sin embargo, la conservación en condiciones de luz no dio buen resultado.

La recuperación de los cultivos tras el periodo de conservación en condiciones de crecimiento lento ha sido satisfactoria, creciendo óptimamente *in vitro* el 50% de los clones, pertenecientes a 7 géneros, tras 3 subcultivos.

Aunque el protocolo desarrollado aquí ha sido eficaz para la conservación in vitro de la mayoría de los genotipos estudiados, será necesario estudiar los casos particulares no adaptados al protocolo.

Este trabajo supone un punto de partida para el desarrollo de protocolos de conservación in vitro de especies frutales a más largo plazo.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

Desde la antigüedad el ser humano dispone de los recursos genéticos para su beneficio, usando la diversidad biológica existente. El aumento de la población y la demanda de alimentos impulsan a ocupar nuevos espacios con la consecuente destrucción de las especies existentes, además la manipulación de otras para domesticarlas y obtener producción de variedades mejoradas altamente homogéneas para la alimentación, provoca la reducción de la variabilidad genética de las especies cultivadas, ocasionando una “erosión genética” (Jaramillo y Baena, 2000). En este contexto es cuando se recurre a las fuentes genéticas originales de la variabilidad, que se deben preservar adecuadamente.

Aunque no se ha hecho un inventario del total de la flora presente en el mundo, se estima que existen 300.000 especies, de las cuales muchas están en peligro de extinción. Esta situación genera la necesidad de implementar estrategias para preservar la biodiversidad del planeta, tales como el ‘Plan de acción mundial para la conservación y uso sostenible de los recursos genéticos vegetales para la alimentación y la agricultura’ (FAO, 2005). En consecuencia, la mayoría de los países han prestado especial interés a mantener y ampliar la base genética de las especies que existen en sus territorios.

Esta actividad científica fue propuesta en los años 70 del siglo XX con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir de la preservación de diferentes especies y genes de interés. Cuando se habla de preservación de germoplasma hay que subrayar que el objetivo es conservar, con la mayor integridad posible, la variabilidad genética de las poblaciones seleccionadas.

La estrategia a seguir para la conservación de germoplasma, depende de la naturaleza del material vegetal, y está definida por la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción y el tamaño de sus individuos (CIAT, 2007). De acuerdo con estas características se han intentado diversas alternativas de conservación, que van desde el tradicional banco de semillas hasta el mantenimiento de áreas de reservas. Sin embargo, en muchos casos el mantenimiento no es posible y los riesgos de pérdidas por manipulación o desastres naturales son muy altos. Por lo tanto, se busca implantar

nuevas estrategias para conservar los recursos genéticos de la forma más eficiente posible (FAO, 2013).

Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal (Nodarse *et al.*, 1998):

- Métodos de conservación *in situ*
- Métodos de conservación *ex situ*

Los métodos de conservación *in situ* se basan en la conservación de las plantas en sus hábitats naturales e incluyen la conservación en Parques Nacionales y en Reservas Ecológicas, los cuales requieren un considerable espacio físico, altos costos asociados a la necesidad de mano de obra especializada, control permanente de enfermedades y malezas, a la par que las plantas están expuestas a las inclemencias del clima y de los incendios.

Por otra parte, los métodos de conservación *ex situ* se basan en el mantenimiento del material biológico fuera de su ambiente natural, conservado en espacios acondicionados, tales como bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro* y colecciones de plantas (en campo, viveros o jardines botánicos).

En general, los bancos de semillas constituyen uno de los métodos más adecuados para la conservación de germoplasma *ex situ*, porque permiten almacenar una gran variabilidad genética en forma económica y práctica. Para la conservación de semillas la International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) recomienda su desecación hasta un 3-7% de humedad y su almacenamiento a bajas temperaturas (-18°C). Este protocolo de conservación es el más recomendado para la mayoría de las especies que se propagan por semillas ya que resisten la desecación sin que ello implique pérdida de viabilidad, y las semillas pueden conservarse en condiciones adecuadas durante décadas o incluso periodos mayores sin que pierdan de forma significativa su capacidad germinativa. A las semillas que presentan estas características se las denominan “semillas ortodoxas” como las semillas de cereales, leguminosas comestibles y oleaginosas, o por ejemplo el tabaco, el tomate y la lechuga. Sin embargo, en ciertos casos este método de conservación no se aplica porque la especie se propaga, en la práctica, vegetativamente (como los frutales) o bien porque sus semillas pierden rápidamente la viabilidad cuando son sometidas a procesos de desecación, denominadas “semillas recalcitrantes”. Donde haya problemas genéticos y de propagación, la diversidad genética de estas especies se puede conservar mediante bancos de plantas en campo o mediante técnicas de conservación *in vitro* (Graudal *et al.*, 1997). Se utilizan

también para conservar especies que tardan mucho en producir semilla, como es el caso de las forestales.

Los Bancos de Germoplasma para la conservación de los recursos fitogenéticos implican la generación de una gran cantidad de información que debe ser registrada o almacenada de alguna forma, es decir, debe ser documentada y se entiende por documentación al proceso de identificar, adquirir, clasificar, almacenar y difundir la información del germoplasma (CIAT, 2007).

Los recursos fitogenéticos constituyen un reservorio de información genética imprescindible para la solución de muchos de los problemas a los que se enfrenta la agricultura. Los métodos para asegurar su conservación son diversos y cada uno de ellos posee sus ventajas e inconvenientes. Por ello, se considera que el conjunto de técnicas de conservación *in situ* y *ex situ*, son métodos complementarios, no excluyentes, para lograr el objetivo común de preservar los recursos fitogenéticos, como parte esencial de una estrategia global para la conservación de la biodiversidad. En las investigaciones científicas es crucial disponer de colecciones activas a disposición de mejoradores e investigadores, por ello los bancos de germoplasma no deben limitarse a la mera conservación a largo plazo.

1.2. EL CULTIVO *IN VITRO* EN LA CONSERVACIÓN DEL GERMOPLASMA

La conservación de germoplasma *ex situ*, puede realizarse mediante el cultivo *in vitro* de tejidos. El cultivo *in vitro* se ha confirmado hoy en día como una herramienta que facilita la multiplicación, la conservación y el almacenamiento de recursos genéticos de especies de propagación vegetativa o plantas que no producen semillas (Withers, 1986; Grout, 1990) o con semillas recalcitrantes (Ashmore, 1997; Engelmann, 2011). Muchos cultivos con propagación vegetativa como tubérculos ornamentales, plantas medicinales y muchas otras especies de frutales se conservan *in vitro* (Akin-Idowu *et al.*, 2009) sin afectar a la viabilidad y crecimiento del material vegetal (Ozudogru *et al.*, 2010). Además, la conservación *in vitro* es considerada como complementaria a las demás técnicas de conservación de germoplasma para

proporcionar más seguridad para aquellas especies amenazadas por la erosión genética (Mlot, 1989). A pesar de sus mayores costes (Pence, 2011) el cultivo *in vitro* permite reducir las necesidades de espacio y facilita el intercambio de material en adecuadas condiciones sanitarias (Engelmann, 2011) para los Bancos de Germoplasma.

El desarrollo de técnicas de conservación alternativas es muy deseable. Durante las últimas décadas, diferentes métodos de conservación *in vitro* se han desarrollado como sustitutos o duplicados seguros de los bancos de genes de campo, proporcionan herramientas muy útiles para la conservación de la biodiversidad en numerosas partes del mundo (Reed *et al.*, 2011) y se utilizan ampliamente en función de la duración del tiempo de almacenamiento requerido (Engelmann, 1991a y 1997; Ashmore, 1997).

Hay tres tipos de almacenamiento *in vitro* para la conservación:

- i) cultivo y propagación estándar *in vitro*;
- ii) cultivo en crecimiento ralentizado o mínimo;
- iii) suspensión del crecimiento (crio-conservación).

La elección de uno u otro tipo de almacenamiento depende del tiempo de conservación requerido. A corto o medio plazo, el objetivo es reducir la velocidad de crecimiento del material vegetal, y en este caso se puede utilizar el método de crecimiento ralentizado. Por otra parte la crio-conservación garantiza la conservación *in vitro* por periodos prolongados de tiempo (Ozodogru *et al.*, 2011).

1.2.1. CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* es la técnica para lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas (explanto), tales como embriones, semillas, tallos, puntas de raíces, callo, células individuales y granos de polen (Jones, 1979).

Con esta técnica es posible reproducir plantas de todas las especies si se conocen sus requerimientos nutritivos, hormonales y de cultivo. Además deben mantenerse las condiciones asépticas evitando las contaminaciones por hongos o bacterias que afectan negativamente al cultivo de tejidos (Marín, 1993).

Separar células de un tejido, un trozo de tejido de un órgano, o bien un fragmento de un órgano de la planta entera es en cierto modo romper o alterar el equilibrio natural de los mismos. Sin embargo, su cultivo de forma aislada en un medio nutritivo conocido puede ser de gran utilidad para comprender su funcionamiento y estudiar la influencia de un gran número de variables.

De esta forma, la técnica del cultivo *in vitro* permite el estudio de los diferentes factores que afectan al desarrollo de la planta, ya que se puede variar cada factor o conjunto de factores, manteniendo constantes los demás. Nos permite estudiar las necesidades nutritivas de las plantas, desarrollando tejidos vegetales en medios totalmente sintéticos y perfectamente definidos. Además, permite controlar mejor las condiciones ambientales (luz, temperatura y humedad) y la aplicación de tratamientos hormonales, obteniendo éxitos en casos en que los métodos tradicionales fallan.

El cultivo *in vitro* permite trabajar con un número muy grande de individuos ocupando poco espacio, lo que aumenta las posibilidades de éxito, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos o en vías de extinción. Las plantas cultivadas tienen un tamaño reducido, por lo que pueden cultivarse con una gran densidad, centenares de plantas por metro cuadrado de estantería, lo que supone un ahorro de espacio, de superficie de viveros, de costes de almacenamiento y de labores (Marín, 1983).

A veces es posible propagar especies *in vitro* que presenten gran dificultad para ser multiplicadas *in vivo*, debido al proceso de rejuvenecimiento que suele producirse (Pierik, 1975). El crecimiento de las plantas propagadas *in vitro* es frecuentemente más vigoroso que el de las clonadas *in vivo*; esto se debe sobre todo al rejuvenecimiento y/o al hecho de que las plantas *in vitro* se encuentran libres de enfermedades (Pierik, 1990). Al producirse la propagación en condiciones de asepsia no deberían producirse pérdidas por plagas o enfermedades y las plántulas producidas finalmente deberían ser libres de bacterias y hongos (Jones, 1979; Marín, 1993; López Corrales, 1996).

Debido a la existencia de condiciones controladas, se puede eliminar el efecto estacional y conseguir una producción homogénea a lo largo del año (Pierik, 1975; Jones, 1979).

Por otro lado el clonado *in vitro* puede presentar ciertas desventajas o inconvenientes, como la necesidad de instalaciones muy especializadas: cámara de cultivo, cabina de flujo laminar, etc. Es un método que resulta caro, el estaquillado tradicional es más barato. El clonado *in vitro* exige una aportación de mano de obra

importante ya que exige el subcultivo de las plantas en nuevo medio cada 4-6 semanas, lo que redundaría en costes relativamente altos para las plantas producidas o conservadas de esta forma, aunque puede compensarse por la gran cantidad de planta producida (Smith, 1986).

1.2.2. CRECIMIENTO RALENTIZADO

El objetivo de la técnica del crecimiento ralentizado *in vitro* es reducir el crecimiento y prolongar los intervalos de subcultivo del material. Esta técnica ha sido usada para mantener colecciones en crecimiento mínimo, para lo cual se requiere: reducir la temperatura, reducir las condiciones de luminosidad, modificar el medio de cultivo, adicionar inhibidores osmóticos o retardantes del crecimiento y deshidratadores de tejido o modificar la fase gaseosa del recipiente de cultivo. Esta técnica mediante la modificación de uno o más de estos factores es utilizada para la conservación de numerosas especies.

El subcultivo frecuente de muchos clones es costoso y laborioso, y además, el riesgo de perder los materiales a través de la contaminación o errores humanos en la esterilización de cada subcultivo y el riesgo de perder la integridad genética a través de la variación somaclonal aumenta con el tiempo en cultivo. La conservación *in vitro* en crecimiento lento se ha desarrollado para resolver algunos de estos problemas mediante la prolongación de los intervalos de los subcultivos (Hao y Deng, 2003; Marino *et al.*, 1985; Capuana y Di Lonardo, 2013).

Este método constituye una de las principales variantes que puede garantizar el éxito de un programa de conservación, debido a que es relativamente sencillo y puede ser establecido con facilidad con el equipamiento que normalmente existe en un laboratorio de cultivo de tejidos.

Estas técnicas de almacenamiento se realizan a medio plazo, es decir, se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta. Tiene como objetivos incrementar la longevidad *in vitro* de los cultivos sin que se produzcan cambios genéticos, por tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino

una disminución en la velocidad con que ocurren los mismos y así se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (Roca *et al.*, 1994).

Al reducir el metabolismo celular y con ello reducir el crecimiento, el número de subcultivos también se reduce, permaneciendo en el mismo medio de cultivo durante meses, hasta un año, o incluso más, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos. Autores como García *et al.* (2004) conservaron plantas *in vitro* de caña de azúcar, durante seis meses, con calidad y sin realizar subcultivos, con la reducción de las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) entre 25 y 50% de su concentración normal. Y en castaño, los cultivos permanecieron 18 meses en el mismo medio de cultivo a 8°C (Capuana y Di Lonardo, 2013).

La limitación del crecimiento por efecto de la concentración osmótica se debe a la reducción de la adsorción de agua y nutrientes del medio de cultivo. La sacarosa como es altamente metabolizable, puede actuar como agente osmótico en concentraciones elevadas. Otros agentes osmóticos no metabolizables, como el manitol y el sorbitol, son efectivos en la limitación del crecimiento, porque interactúan con el contenido de sacarosa y la temperatura de conservación (Bhat y Chandel, 1993).

Autores como Bertrand *et al.* (1992), estudiaron la respuesta de micro esquejes de cafeto en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa y su interacción con la temperatura, observando que las bajas concentraciones redujeron el crecimiento, enraizamiento y porcentaje de supervivencia, después de siete meses conservados a 20°C. Los mejores resultados los obtuvieron en un medio de cultivo que contenía como mínimo 20 g.l⁻¹ de sacarosa y a una temperatura de 20 °C.

Eventualmente en los cultivos conservados *in vitro*, debido a las bajas temperaturas, la alta concentración osmótica, la reducción de la concentración de sales inorgánicas y la presencia de inhibidores del crecimiento, se puede producir un oscurecimiento de los tejidos, seguido por defoliación. Esto se atribuye a la oxidación fenólica y a la inducción de senescencia por la presencia de determinadas concentraciones de gases como el etileno, especialmente cuando se utilizan frascos pequeños o sellados herméticamente. Roca *et al.* (1994), observaron una disminución de la defoliación y una reducción de la tasa de crecimiento a la mitad, en dos variedades de yuca, al adicionar al medio de cultivo un 0.25% de carbón activado.

La intensidad y calidad de la luz, son otros factores importantes en el control de la velocidad de crecimiento, especialmente en su interacción con la temperatura, que

como ya se ha comentado, es otro de los factores muy utilizados en la conservación en condiciones de crecimiento ralentizado.

La disponibilidad de bancos de germoplasma *in vitro* en condiciones de crecimiento lento, han contribuido al avance de la conservación de un elevado número de especies vegetales. Algunos ejemplos de conservación de germoplasma en crecimiento lento son usados como rutina en Centros Internacionales, como la conservación de germoplasma de mandioca en el CIAT en Cali (Colombia), y la conservación de germoplasma de papa en el CIP (Centro Internacional de la Papa) en Perú (Scocchi y Rey, 2010).

1.2.3. CRIOCONSERVACIÓN

La crioconservación implica enfriar el material vegetal a temperaturas ultra bajas en las que el metabolismo se suspende. Esta técnica de conservación *in vitro* a largo plazo consiste en el almacenamiento a temperatura del nitrógeno líquido (-196°C), con lo cual se consigue la detención del crecimiento hasta llegar a un estado de "suspensión animada".

Las técnicas de conservación de germoplasma mediante el uso de la crioconservación ofrecen ventajas en relación con las técnicas tradicionales, pues permiten la conservación a largo plazo (años), presenta bajos costos de mantenimiento y una fácil manipulación de las muestras. En 1968, Quatrano consiguió la crioconservación de células de lino, pero los primeros estudios sobre la crioconservación de plantas basada en la vitrificación completa fueron realizados por Uragami (1989) con embriones somáticos de *Asparagus officinalis* L. y Langis (1989) con suspensiones celulares de *Brassica campestris*. A partir de estos estudios, numerosos trabajos dan muestra de la importancia de esta técnica, de sus usos y aplicaciones. La aplicación de esta estrategia ha permitido el almacenamiento de materiales vegetales como células nucleares de *Citrus sinensis* (Sakai *et al.*, 1990), protoplastos de *Secale cereale* (Langis y Steponkus, 1991), ápices vegetativos de *Ananas comosus* (González *et al.*, 1998), yuca (Charoensub *et al.*, 1999), boniato (Pennycooke y Towill, 2000) y *Anigozanthos humilis* (Turner *et al.*, 2001), entre otros.

En particular, la crioconservación se ha aplicado en muchas especies para la conservación de polen, meristemos, ápices, embriones cigóticos, embriones somáticos y suspensiones celulares. Se reconocen dos grupos de técnicas para conseguir la crioconservación: a) las técnicas clásicas basadas en la deshidratación química parcial con osmoprotectantes y con el congelamiento programado, y b) las nuevas técnicas basadas en la vitrificación con congelamiento rápido. Esta última técnica evita la formación de cristales de hielo en el interior de los tejidos que son los responsables del daño mecánico que se produce a las membranas celulares durante la congelación (Towill, 1996) ya que se produce el cambio del estado líquido a un estado intermedio llamado vítreo. Estas técnicas combinan el uso de crioprotectores y de soluciones de vitrificación con técnicas de deshidratación y encapsulación. Dentro de estas nuevas técnicas se reconocen siete procedimientos (Engelmann, 2000):

- Encapsulación-Deshidratación
- Vitrificación
- Encapsulación-Vitrificación
- Desecación
- Precultivo
- Precultivo-Desecación
- Gotita Congelada.

Existen mecanismos que determinan cómo los sistemas biológicos responden ante la disminución de las temperaturas y la solidificación del agua líquida, por ello, es necesario conocer los aspectos básicos que tienen lugar durante la congelación del agua como evento decisivo para desarrollar una metodología de crioconservación. En este sentido, destacan los procesos de nucleación y vitrificación. El procedimiento de vitrificación ha demostrado ser el más efectivo y empleado por muchos autores (Lambardi *et al.*, 2000; Tsukazaki *et al.*, 2000; Hirai y Sakai, 2003; Wang *et al.*, 2004; Caccavale *et al.*, 2005).

La disponibilidad de bancos de germoplasma *in vitro* en condiciones de conservación a temperaturas ultra bajas (crioconservación), ha contribuido de manera notable al avance de la conservación de especies vegetales. Además, es importante resaltar que las técnicas de crioconservación ofrecen una alternativa muy valiosa cuando se piensa en conservar los recursos fitogenéticos por tiempo ilimitado (años).

1.3. LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA FRUTAL

La conservación de germoplasma frutal se realiza hoy en día por medio de diversas técnicas tanto en colecciones en campo como en colecciones *in vitro* o crioconservadas.

El trabajo de los bancos de germoplasma comprende las actividades siguientes: adquisición del material, conservación propiamente dicha, multiplicación, caracterización/evaluación, documentación e intercambio.

La recolección puede realizarse en hábitats naturales, en campos de cultivo, directamente de los agricultores o incluso en mercados locales, siendo siempre el principio fundamental recoger la máxima cantidad de variabilidad en el mínimo número de muestras. Además del material, es muy importante recoger lo más detalladamente posible la información asociada al mismo, incluyendo datos botánicos, datos referentes a la zona, usos, técnicas de cultivo y cualquier otra observación de interés.

1.3.1. COLECCIONES EN CAMPO

La conservación mediante colecciones de plantas mantenidas en el campo se realiza fundamentalmente en especies sexualmente estériles o que poseen semillas que no pueden ser conservadas durante largos periodos de tiempo. Se usa también en especies de reproducción vegetativa para el mantenimiento de clones y en aquellas que tardan mucho en producir semilla. La conservación del germoplasma frutal tiene algunas de esas limitaciones, ya que para la mayoría de frutales el almacenamiento de semillas no es un buen método debido a que la semilla no tiene la misma dotación genética y características de la variedad que queremos conservar y con problemas de propagación, por lo que los recursos genéticos de árboles frutales se conservan principalmente en huertos como bancos genéticos de campo (Shen, 1992). Este método involucra una inversión de espacio, tiempo, personal y operaciones que deben justificarse en términos de necesidad real, de acuerdo a criterios lógicos, científicos y socioeconómicos, tales como la necesidad, el valor y el uso de las especies (CIAT, 2007).

Las colecciones de plantas que se mantienen en el campo, hay que regenerarlas periódicamente dependiendo de la duración del ciclo de la planta. Este tipo de conservación tiene como limitante la necesidad de grandes extensiones de superficie de tierra fértil, especialmente al tratarse de árboles, y requiere un coste de mantenimiento elevado sobre todo si las plantas necesitan regeneraciones anuales o muy frecuentes.

El coste de mantenimiento asociado a las labores agrotécnicas es alto y se hace necesario controlar plagas y enfermedades por el riesgo de pérdidas. Evitar plagas, enfermedades e insectos vectores es de gran importancia para las colecciones de campo, por eso cuando es posible, el banco de germoplasma de campo debe estar ubicado en un emplazamiento libre de enfermedades y plagas patógenas más importantes o alejado de zonas de las que se tiene conocimiento de infección por hongos y virus, con el fin de reducir los riesgos y los costos de manejo relacionados con la protección fitosanitaria y garantizar una fuente limpia de material para su distribución. Antes de la plantación se debe comprobar que los suelos están libres de hongos, termitas y otros parásitos transmitidos por el suelo y asegurar que se proporciona el tratamiento adecuado para limpiar el suelo antes de la plantación.

Además son vulnerables a los desastres climáticos, anomalías climáticas o a condiciones ecológicas adversas como sequías, inundaciones, incendios, vientos, etc. Por todo esto, el desarrollo de nuevas técnicas de conservación, han permitido preservar mejor los recursos genéticos importantes para muchos países (Ortiz, 2000).

1.3.2. CONSERVACIÓN *IN VITRO*

Otro método de conservación de germoplasma frutal, es mediante el cultivo *in vitro* de tejidos. El potencial de los métodos del cultivo *in vitro* para la conservación de especies de plantas con dificultades para la conservación y almacenamiento como es el caso de las especies frutales, es amplio y necesario en muchos casos. El cultivo *in vitro* facilita la multiplicación, la conservación y el almacenamiento de recursos genéticos de especies de propagación vegetativa o plantas que no producen semillas o con semillas recalcitrantes. Por ejemplo, las semillas de una gran proporción de especies de árboles tropicales pierden viabilidad muy rápidamente y mueren poco después de haber sido

recogidas del árbol (Theilade *et al.* 2004).

Mantener colecciones de frutales *in vitro* es un complemento a la tradicional conservación en campo de las colecciones varietales y de los Bancos de Germoplasma.

Las especies frutales tienen unas características que condicionan su desarrollo *in vitro* porque son sensibles a la oxidación al ser introducidos en cultivo *in vitro*. Los explantos jóvenes de especies leñosas a menudo excretan al medio de cultivo compuestos fenólicos, visibles como pigmentos marrones y/o negros. En los explantos de árboles adultos el problema se acentúa, por lo que se recomienda el empleo de explantos primarios juveniles.

El tipo de material más utilizado para el establecimiento *in vitro* son los segmentos nodales de explantos juveniles, las yemas axilares obtenidas por rejuvenecimiento de plantas adultas, y los embriones cigóticos y plántulas obtenidas de semillas de origen sexual. Es mucho más fácil propagar material juvenil que el material adulto. La introducción e inicio en cultivo *in vitro* es una tarea costosa y lenta. La inducción de yemas adventicias es el método más empleado. Las yemas se inducen directamente sobre el explanto sin pasar previamente por una etapa de callo. En general, cuanto más joven es el tejido, tanto mejor es la respuesta a los tratamientos (Villalobos *et al.*, 1982; Olmos *et al.*, 2010).

Existen ejemplos de conservación de germoplasma frutal mediante los dos sistemas básicos de conservación *in vitro*, uno mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas (crecimiento lento o ralentizado), y otro mediante la suspensión total del crecimiento y del metabolismo celular (crio-conservación).

En cultivos frutales como los cítricos (Hor *et al.*, 2005) y el café (Dussert *et al.* 2011) se pensó que no sería posible obtener supervivencia después de la exposición de sus semillas al nitrógeno líquido. Sin embargo, finalmente se logró mediante el control de los niveles de desecación y la optimización de los métodos de enfriamiento y calentamiento, lo que permitió ampliar los conocimientos sobre esas plantas. Uno de estos métodos está orientado a semillas recalcitrantes que son extremadamente sensibles a la desecación y no pueden sobrevivir a contenidos de humedad inferiores al 60% (por ejemplo, cítricos). Estas semillas se almacenan en un estado de vitrificación en el que no se forman cristales de hielo a pesar de encontrarse a temperaturas inferiores a 0 °C (Fahy *et al.*, 1984).

El método basado en el crecimiento mínimo es el más generalizado. Se basa en modificar las condiciones óptimas de cultivo, para disminuir la velocidad de

crecimiento normal de la especie objeto de estudio, con lo cual se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco. Por otra parte, en los procesos de renovación de los cultivos (subcultivos) del material conservado bajo crecimiento lento hay posibilidades de seleccionar los explantos mejores o más vigorosos por parte de la persona que realiza estos procesos. El crecimiento lento se ha aplicado ampliamente para este propósito en árboles frutales (Moriguchi *et al.*, 1988, 1990; Orlikowska, 1992; Van den Houwe *et al.*, 1995; Oka y Niino, 1997).

Hay ejemplos de almacenamiento en frío de cultivos *in vitro* de diversas especies de *Prunus*. Tanto el portainjertos de cerezo 'Gisela 5 ®', como el patrón de manzano 'M26' o el porta-injertos de peral 'A74' se mantuvieron 9 meses con un buen nivel de calidad de los cultivos y fueron capaces de reanudar el crecimiento con rapidez cuando regresaron a sus condiciones proliferativas estándar (Lambardi *et al.*, 2006). Pannović (1996) mantuvo ápices de ciruelo en frío durante 6 meses, y tres cultivares de cerezo almacenados a 4 °C se mantuvieron viables durante más de 30 meses (Kovalchuk *et al.*, 2011). Estudios sobre almacenamiento en frío *in vitro* de *Prunus* micropropagados dieron buenos resultados hasta 10 meses a -2°C (Druart, 1985; Marino *et al.*, 1985). La experiencia con muchas plantas leñosas ha demostrado que el periodo de almacenamiento se puede prolongar a 2 años o incluso más, aunque 12 meses parece ser un objetivo realista para la mayoría de especies (Grout, 1995; Reed, 1999).

El almacenamiento de germoplasma en crecimiento lento es actualmente un método viable para mantener grandes colecciones en poco espacio, libres de riesgos que causan plagas y enfermedades. El establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* en crecimiento ralentizado se ha convertido en una alternativa importante al mantenimiento convencional, en el campo, de grandes colecciones.

1.3.3. FRUTALES PARA LA CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO LENTO

Generalmente las especies frutales son muy heterocigóticas, por lo que la reproducción sexual produce descendencias diferentes genéticamente a los individuos parentales debido a la recombinación de genes. Esto ha posibilitado la obtención de

nueva variabilidad y la selección de individuos mejorados genéticamente. Sin embargo, si queremos mantener los caracteres de un individuo o de un cultivar, la reproducción vegetativa (clonal) es la indicada, ya que no produce variabilidad genética.

La conservación de especies frutales de zonas templadas de distintos géneros y especies, forman parte de las tareas de mantenimiento de los Bancos de Germoplasma de la Estación Experimental de Aula Dei, y aunque mayoritariamente se trabaja con el género *Prunus*, se incluyen clones de los géneros: *Punica*, *Ficus*, *Cydonia*, *Pyrus*, *Malus*, *Eriobotrya* y *Crataegus*. Estas son las especies que han sido incluidas en este proyecto para el desarrollo de las técnicas de conservación en crecimiento ralentizado *in vitro*.

- **GÉNERO PRUNUS**

- *Prunus cerasifera*

- ‘MIROBOLÁN 29 C’**

- Es un patrón seleccionado en la universidad de California, Davis (EEUU).

- Posee un vigor elevado, el anclaje del sistema radicular es bueno aunque un poco superficial y serpea bastante. Tiene buena adaptación a distintos tipos de suelos con condiciones de humedad. Es resistente a suelos calizos y con problemas de clorosis.

- Es altamente resistente a nematodos del grupo *Meloidogyne*, moderadamente resistente a *Agrobacterium*, *Armillaria*, *Phytophthora*, *Verticilium* y a podredumbre de cuello. Muestra sensibilidad a *Pratylenchus vulnus*. Posee muy buena propagación por estaquilla leñosa (Felipe 1989).

- ‘MIROBOLÁN P’**

- Clon procedente de polinización libre de mirobolán (*P. cerasifera*) en proceso de selección en la Estación Experimental de Aula Dei por el Departamento de Pomología (Zaragoza), cuya característica principal es el color rojo de sus hojas.

- ‘MIROBOLÁN 605’, ‘MIROBOLÁN 469’, ‘MIROBOLÁN 543’ y ‘MIROBOLÁN 743’**

- Clones seleccionado por el Departamento de Pomología en la E. E. Aula Dei (Zaragoza) procedentes de polinizaciones libres de mirobolán.

A partir de una población de 754 clones (Cambra y Cambra, 1972) se seleccionaron 26 clones por su aptitud a la propagación por estaquilla leñosa y ensayos de compatibilidad con variedades de ciruelo y albaricoquero (Cambra y Cambra, 1973).

‘MIROBOLÁN P2175’ y ‘MIROBOLÁN P2980’

Son preselecciones del INRA de Burdeos (Francia) de origen rumano que muestran resistencia a nematodos *Meloidogyne* spp. (Scotto la Massese *et al.*, 1991; Esmenjaud *et al.*, 1992)

Utilizados para conferir tolerancia a la asfixia radicular y resistencia estable a los nematodos agalladores.

‘MIROBOLÁN B’

Es un clon seleccionado en la estación inglesa de East Malling (Felipe, 1989).

Posee un sistema radicular semi-profundo que proporciona buen anclaje y se comporta bien en una amplia gama de suelos (Westwood, 1993) siendo resistentes a caliza y relativamente resistente a la sequía (Cambra, 1983). Produce árboles vigorosos de buen tamaño que dan una excelente producción pero retrasa un poco la entrada en esa producción. Esto se ha de tener en cuenta para las variedades precoces.

Es sensible a los nematodos *Meloidogyne incógnita*, *M. javanica* y *Pratylenchus vulnus*, así como a *Armillaria* y *Agrobacterium*. A su vez, es moderadamente resistente a *Verticilium*, a *Phytophthora* y al chancro bacteriano del cuello (Crossa-Raynaud y Audergon, 1987).

‘ADARA’

Es un patrón seleccionado en la Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza.

Soporta temperaturas bajas en invierno y tiene una moderada resistencia a la asfixia de cuello, de raíces y a *Verticilium*. Destaca por su elevada tolerancia a clorosis (Breton *et al.*, 1972; Perry, 1987; Moreno *et al.*, 1996).

Su entrada en producción es bastante temprana y presenta buena productividad. Se usa como patrón de ciruelo y melocotonero. Es compatible con algunas variedades de cerezo, albaricoquero y almendro.

- *Prunus cerasifera* × *munsoniana*

‘MARIANA 2624’

Es una selección realizada en la Universidad de California a partir de una población de plantas de Mariana (*P. cerasifera* × *munsoniana*) (Felipe, 1989).

El sistema radicular es relativamente superficial y serpea bastante. Produce árboles de tamaño medio e induce buena productividad. Además hay que tener en cuenta que los frutos maduran ligeramente adelantados.

Es resistente a *M. incognita* y *M. javanica*, a asfixia radicular y a la asfixia de cuello, y moderadamente resistente a *Armillaria*, *Agrobacterium* y *Phytophthora*. Es sensible al nematodo *P. vulnus* y al chancro bacteriano, y algo sensible a *Verticilium* (Felipe, 1989).

Es un patrón útil para suelos con problemas de encharcamiento ya que se adapta a suelos húmedos y pesados (Crossa-Raynaud y Audergon, 1987).

‘MARIANA GF-8-1’

Es una selección realizada en La Grande Ferrade de entre las plantas procedentes de semilla de Mariana (*P. cerasifera* × *munsoniana*) (Felipe, 1989).

Es resistente a los nematodos *Meloidogyne*, a los ataques de *Armillaria* y a la asfixia radicular, pero es sólo moderadamente resistente a *Verticilium* y *Agrobacterium*, y sensible al mal del plomo en vivero (*Stereum purpureum*).

El sistema radicular es relativamente superficial pero no serpea, adaptándose a diferentes tipos de suelos. Sin embargo, los problemas de compatibilidad que plantea con algunas variedades de ciruelo europeo y de albaricoquero aconsejan que se disponga de buena información antes de usarlo. Además, no es compatible con melocotonero ni con la mayor parte de las variedades de almendro (Felipe, 1989).

- *Prunus cerasifera* x *armeniaca*

‘HÍBRIDOS CIRUELO X ALBARICOQUIERO’

Son híbridos de *P. cerasifera* y *P. armeniaca* obtenidos por polinización dirigida en la E. E. de Aula Dei que se han multiplicado *in vitro* a partir del cultivo de embriones (Daorden *et al.*, 2001; Daorden, 2003) y se encuentran en proceso de selección.

El número de híbridos provenientes de semilla fue de 77 para el presente estudio.

- *Prunus domestica*

‘REINA CLAUDIA VERDE’

Es una variedad tradicional de ciruelo europea de origen muy antiguo.

El fruto es de tamaño medio de color verde, el hueso es muy adherente y de tamaño medio y la piel es fuerte y está bien adherida a la carne (Da Graça, 2006). Su floración es temprana, por eso puede sufrir con las heladas primaverales. Prefiere los climas templados, pero se desarrolla bien en climas relativamente fríos.

Reina Claudia es uno de los frutales de hueso de crecimiento lento más rústicos y fáciles de cultivar, resiste bien las bajas temperaturas y es moderadamente resistente a *Verticilium*, *Agrobacterium* y a clorosis; puede ser utilizada como patrón de otros frutales por su rusticidad.

- *Prunus insititia*

‘POLLIZO DE MURCIA 25’

Es un patrón procedente de una prospección realizada por la E.E. Aula Dei en la región de Murcia donde estos ciruelos fueron introducidos hace siglos, afincados allí y considerados hoy como autóctonos. El nombre lo ha tomado de su sistema de propagación, ya que en Murcia se denominan “pollizos” a las sierpes, y éste ha sido tradicionalmente el sistema de propagación de estos patrones.

Es resistente a la asfixia radicular, a los suelos compactos, calizos y algo salinos (Herrero, 1964). Gran polivalencia de adaptación a suelos difíciles pero debe evitarse los pedregosos y secos. Es sensible a sequía.

Constituye el patrón de uso generalizado, para el cultivo de melocotoneros, albaricoqueros y ciruelos.

- *Prunus cerasus*

‘CAB 6P’

Patrón del grupo cerezo que procede de semillas de cerezas ácidas o guindas (*P. cerasus*), seleccionado en el Instituto Colvazioni de Arbórea, Bologna (Italia).

Se propaga fácilmente por hijuelos o sierpes que nacen de las raíces de los portainjertos en huertos de cerezo ya establecidos o de árboles aislados de la propia especie. Se adaptan bien a suelos poco profundos.

Desde el punto de vista sanitario es sensible a *Armillaria* y *Verticilium*, así como a los nematodos *Pratylenchus vulnus*. Es relativamente tolerante a suelos húmedos, así como a la podredumbre de cuello debido a *Phytophthora* y a *Agrobacterium*. Inmune a los nematodos *Meloidogyne*, *Incognita* y *M. javanica*.

- *Prunus avium* x *pseudocerasus*

‘COLT’

Es un híbrido entre las especies *P. avium* y *P. pseudocerasus*, seleccionado en la Estación inglesa de East Malling, en 1966.

Es útil para zonas con suelos no calizos y sin problemas de *Agrobacterium* debido a su sensibilidad a clorosis y a sequía, pero es resistente al chancro bacteriano (*Pseudomonas morsprunorum*) y a la enfermedad específica de la replantación del cerezo (*Thielaviopsis basicola*) (Felipe, 1989).

Es compatible con variedades de cerezo, guindo y ornamentales.

- *Prunus persica*

‘GF 305’

Es un patrón franco de semilla de melocotonero selección de Montreuil, en el INRA-La Grande Ferrade, en Burdeos (Francia).

Produce árboles con muy buen vigor una rápida entrada en producción y una buena compatibilidad con todas las variedades. Por el hecho de proceder de semilla proporcionan una mayor variabilidad, en comparación a los patrones clonales. La planta es más homogénea, tanto desde un punto de vista morfológico como por su comportamiento agronómico, a causa de la tendencia fuertemente autógama de la especie.

Es muy sensible a clorosis férrica y a asfixia radicular. También demuestra sensibilidad a *Armillaria*, a *Rosellinia* y a nematodos agalladores.

- *Prunus amygdalus* x *persica*

‘ADARCIAS’

Clon espontáneo de híbrido almendro × melocotonero, procedente de la localidad de Arbucias (Gerona) y seleccionado en la E. E. de Aula Dei en Zaragoza (Cambra, 1979; Moreno y Cambra, 1994).

Se trata de un patrón que confiere a la variedad injertada una mayor productividad debido a su menor vigor. El menor vigor debe considerarse como una cualidad positiva ya que en general, las combinaciones melocotonero / híbrido almendro × melocotonero son excesivamente vigorosas (Moreno *et al.*, 1994).

Se adapta bien a suelos calizos, pero requiere un buen drenaje. Es resistente a *Coryneum beijerickii* y *Tranzschelia prunispinosae*.

‘ADAFUEL’

Es un clon híbrido (*P. amygdalus x persica*) seleccionado en la EE Aula Dei (Zaragoza), entre un conjunto de más de sesenta híbridos espontáneos procedentes de varias regiones españolas (Felipe, 1989).

Se trata de un patrón vigoroso, con un sistema radicular muy bien configurado por raíces abundantes y profundas, muy recomendable para terrenos replantados, así como en suelos calizos y pobres.

Posee alta resistencia a clorosis, también se ha observado buen comportamiento frente a *Phytophthora* y a *Agrobacterium*. Por el contrario ha demostrado tener sensibilidad a ciertos nematodos.

‘GF 677’

Es un clon híbrido entre melocotonero y almendro, seleccionado en la estación francesa de La Grande Ferrade, entre una población de híbridos naturales reunidos entre 1944 y 1950.

Tiene un buen comportamiento en terrenos fatigados por plantaciones anteriores de melocotonero y en suelos muy permeables (suelos calcáreos y áridos). Confiere vigor, calidad y productividad. Tolera moderadamente la salinidad.

Es sensible a *Phytophthora*, *Armillaria*, *Agrobacterium* y a nematodos del género *Meloidogyne*, al igual que a asfixia de cuello y radicular. Es tolerante a la clorosis y relativamente resistente a *Phytophthora*.

‘GXN 22’

El híbrido GxN 22 (almendro Garfi x melocotonero Nemared) procede de cruzamientos dirigidos y se caracteriza por el color rojo de sus hojas (Felipe *et al.*, 1997); su resistencia a nematodos agalladores lo hace apropiado para la replantación, salvo en caso de problemas de asfixia de raíces.

Muy buen anclaje radicular y de propagación fácil, elevado vigor y buen comportamiento en vivero. Confiere productividad y precocidad. De gran resistencia en relación con clorosis y a la deficiencia hídrica.

A pesar de su buena adaptación y elevada tolerancia a los suelos calizos, se aconseja limitar su utilización a suelos pobres y secos, sin problemas de encharcamientos, ya que en terrenos fértiles adquieren excesivo vigor.

- *Prunus persica x davidiana*

‘NEMAGUARD’

Seleccionado en California (USA) entre plantas procedentes de Extremo Oriente, se supone que es un híbrido entre *P. persica* y *P. davidiana* (Kester y Grasselly, 1983).

Posee un buen sistema radicular lo que le confiere un buen anclaje. Produce árboles con muy buen vigor, con rápida entrada en fructificación, y con una homogeneidad aceptable.

Es tolerante a los nematodos *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita*, así como *Agrobacterium* por lo que es muy aconsejable para suelos con estos problemas. Sin embargo, es sensible a *Pratylenchus*, *Armillaria*, *Verticillium* y *Phytophthora*, así como a la clorosis férrica en suelos de elevado pH o calizos. Es útil para suelos ácidos o neutros (Felipe, 1989).

‘CADAMAN’

Es un híbrido entre las especies *P. persica* y *P. davidiana* obtenido por el GYDN de Budapest (Hungría).

Es un híbrido usado como portainjerto, compatible con todas las variedades de melocotonero y almendro aportando un vigor similar al híbrido GF 677 y aumenta su productividad.

Es más resistente a la asfixia radicular y tolerante a la clorosis, comportándose bien tras el replante después de melocotonero. Resistente frente a nematodos agalladores.

- *Prunus spinosa*

‘ENDRINO’

La especie *P. spinosa* es una mata alta o arbusto caducifolio que normalmente se eleva hasta 1-2 m de altura, pudiendo alcanzar tallas arbustivas de 4-6 m (Ruiz de la Torre, 2006) extendido por la mayor parte de Europa, Asia occidental y norte de África. Admite bien la poda y el injerto y rebrota con facilidad de raíz

Indiferente en cuanto a suelos, prefiere los formados sobre calizas o margas, siendo más raro en sustratos silíceos. Su temperamento es de luz o media luz, especialmente en las zonas más húmedas, prefiriendo los enclaves frescos (Fernández, 2011). Es una especie de capacidad invasora y colonizadora de calveros de bosques,

prados y laderas de derrubios. Por tanto, se encuentra asociado a majuelos, rosales, zarzas, avellanos, aligustres, etc. (Blanco *et al.*, 1997).

- **GÉNERO *MALUS***

- *Malus domestica*

- ‘MANZANO JORK 9’**

Procede de la Estación Experimental de Jork (Alemania) y es un portainjerto de manzano enanizante. Tiene características como precocidad, eficiencia productiva y calidad de fruta. Se adapta a una amplia gama de suelos, pero su mejor comportamiento se obtiene en suelos ricos y fértiles (Felipe, 1989).

Tiene cierta resistencia a la podredumbre de cuello y es resistente a nematodos *Meloidogyne*, *Verticilium* y bastante resistente a *Armillaria*. Es sensible al fuego bacteriano, al pulgón lanígero y a *Agrobacterium*. Sensible también a las bajas temperaturas de invierno y a la sequía.

- ‘MANZANO DOUCE DE D’JERBA’**

El cultivar de manzano Douce de D’jerba es originario de la isla de D’jerba (Túnez). Su fruto es conocido en la zona por sus cualidades organolépticas (Boudabous *et al.*, 2012). Está adaptado a climas áridos, por lo que es tolerante a sequía.

- **GÉNERO *PYRUS***

- *Pyrus communis*

- ‘PERAL’**

Pyrus communis L., perteneciente a la familia de las Rosáceas, es un frutal de pepita, y se encuentra en casi toda España.

El peral es resistente a los suelos alcalinos y a clorosis, a los suelos húmedos y pesados, así como al frío invernal. También es resistente a *Verticilium*, *Armillaria*, *Agrobacterium* y a los nematodos *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y sensible al pulgón de las raíces *Eriosoma pyricola* y al fuego bacteriano.

El clon EP2 procede de semilla del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

- **GÉNERO *FICUS***

- *Ficus carica*

- ‘NAPOLITANA’**

En la actualidad se distribuye en torno al Mediterráneo y otras regiones del mundo, típica de los secanos mediterráneos (Kislev *et al.*, 2009). La variedad Napolitana es de porte semierecto y vigor fuerte, densidad de ramificación baja y presencia de ramas colgantes y protuberancias ausentes, con una producción media de brevas e higos de tamaño medio de color púrpura. Tolera bastante bien la salinidad.

Sensible a estreses bióticos como la enfermedad del mosaico de la higuera (Baraket *et al.*, 2009). Sensible a algunas plagas como cochinilla, mosca del higo (*Lonchaea aristella*), barrenillo (*Hypoborus ficus*) y algunas enfermedades como podredumbres radiculares o virosis (Virus del Mosaico).

- ‘HIGUERA S4’**

En el centro de investigación 'La Orden-Valdesequera' (Badajoz), se localiza el Banco de Germoplasma de variedades de higuera, que dispone de unas 250 accesiones procedentes en su mayoría de las prospecciones realizadas en distintas Comunidades Autónomas de España (Gil *et al.*, 2009).

El clon S4 procede de semilla obtenido en este centro de investigación.

Perteneciente a la familia de las Moráceas, es una especie típica de los secanos. Tolera bien la salinidad.

- **GÉNERO *PUNICA***

- *Punica granatum*

- ‘GRANADO’**

El granado es uno de los cultivos más antiguos que se conocen (Blumenfeld *et al.*, 2000). Pertenece a la Familia Punicáceas y aunque es originaria de Persia, su cultivo se ha extendido desde el mediterráneo hasta California y México.

El granado se adapta bien en regiones áridas y semiáridas. Crece en una amplia gama de suelos. Tolera una cierta salinidad, la clorosis férrica y suelos calizos. Prefiere un clima templado e incluso caluroso que los relativamente fríos. Es muy sensible a las heladas tardías a partir de la entrada en vegetación.

Es sensible a las plagas como la barrena (*Zeuzera pyrina*), barreneta o barrenillo (*Anisandrus dispar*), pulgón (*Aphis laburoi*), caparreta negra (*Ceroplantes sinensis*) y cotonet (*Planococcus citri*), cochinilla de la tizne (*Saissetia oleae*) y enfermedades como podredumbre del fruto (*Botrytis cinerea*) y cribado (*Clasterosporium carpophilum*).

- **GÉNERO CYDONIA**

- *Cydonia oblonga*

- ‘MEMBRILLERO BA-29’**

- Es una selección clonal de membrillero (*C. oblonga* Miller) realizada en Angers, entre los membrilleros de Provenza, por investigadores del INRA, y utilizada como patrón para peral.

- Induce rápida entrada en fructificación y buena productividad a las variedades. Acepta bien los injertos y trasplanta bien. Su anclaje es de regular a bueno.

- Resistente al pulgón de las raíces y a los nematodos. Más resistente a sequía y a clorosis que otros membrilleros. Sensible a *Armillaria*.

- ‘MEMBRILLERO EM-C’**

- Resultante de una selección de membrilleros realizada en la estación inglesa de East Malling y Long Ashton para seleccionar un clon libre de las virosis conocidas.

- Es muy enanizante y acepta bien el injerto. Da buenos resultados con variedades vigorosas y lentas al entrar en producción (Felipe, 1989). Su anclaje es escaso, por lo que necesita soporte. Es sensible a clorosis y sequía.

- **GÉNERO ERIBOTRYA**

- *Eriobotrya japonica*

- ‘NÍSPERO JAPONÉS’**

- El níspero japonés originario de la zona media y baja del río Daduhe en China (Zhang y col., 1993), fue introducido en Japón donde se naturalizó y lleva cultivándose más de 1000 años. Llegó a Europa procedente de Japón en el siglo XVIII como árbol ornamental.

Es una especie adaptable, moderadamente resistente al frío y resistente a la sequía. Puede cultivarse en una amplia gama de suelos, aunque deben presentar un buen drenaje, ya que es sensible a la asfixia. Es una especie muy sensible a la salinidad y en suelos calizos sufre frecuentemente problemas de clorosis (Martínez-Calvo *et al.*, 2000).

Es sensible al hongo *Fusicladium eryobotryaea* que le produce la enfermedad de Moteado o Roña. Sensible también a los hongos del suelo, como *Armillaria mellea* y *Rosellinia necatrix*.

- **GÉNERO CRATAEGUS**

- *Crataegus monogyna*

- ‘ESPINO ALBAR’**

- La especie *Crataegus monogyna* tiene un área de origen variado: gran parte de Europa, Norte de África y Asia.

- Es un arbusto que puede llegar a alcanzar los 10 m. de altura, aunque no suele pasar de los 5 m. Admite bien la poda, aunque dado su escaso crecimiento ésta no es muy necesaria. Un inconveniente importante es la presencia de espinas a lo largo del tronco y de las ramillas.

- Especie poco exigente, desarrollándose sobre todo tipo de terrenos, tanto en climas fríos como cálidos y desde el nivel del mar hasta los 1.800 metros e incluso más. Soporta bien la sequía (Sallabanks, 1992).

- Es sensible a hongos *Gymnosporangium sp.*, *Nectria sp.*, *Diapotha sp.*, *Phitophthora sp.*, y a la bacteria *Erwinia amylovora*.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Las especies frutales tienen unas características que condicionan su desarrollo *in vitro*. Son especies leñosas, con reposo invernal, y en general son sensibles a la oxidación al ser introducidas *in vitro*. Por estas razones, entre otras, la introducción e inicio de un nuevo cultivo *in vitro* es una tarea costosa y lenta por lo que se suelen

conservar los cultivos para posteriores estudios. Sin embargo, su mantenimiento requiere una carga de trabajo que dificulta la conservación de un número elevado de clones. Por todo lo expuesto, disponer de una técnica *in vitro* eficaz para la conservación de gran número de frutales permitiría mantener colecciones de variedades, como complemento a la tradicional conservación en campo de las colecciones varietales y de los Bancos de Germoplasma, que conlleva el uso de grandes extensiones de campo y el riesgo de ser atacadas por plagas o climatologías adversas.

Este trabajo se basa en la reproducción vegetativa y en la conservación *in vitro* de especies frutales de zonas templadas de distintos géneros y especies, como parte de las tareas de mantenimiento de los Bancos de Germoplasma de la Estación Experimental de Aula Dei. La mayoría de los clones con los se trabaja pertenecen al género *Prunus* pero se incluyen clones de los géneros: *Punica*, *Ficus*, *Cydonia*, *Pyrus*, *Malus*, *Eriobotrya* y *Crataegus*. Con la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento lento o ralentizado se pretende reducir el crecimiento y mantener el material el mayor tiempo posible sin subcultivos. Esta técnica se utiliza para mantener colecciones con un crecimiento mínimo el mayor tiempo posible, por lo que es importante encontrar un protocolo adecuado al mayor número de clones.

Un método eficaz de conservación *in vitro* debe permitir:

- reducir el número de subcultivos sucesivos
- aumentar la capacidad de mantenimiento de cultivos al reducir el espacio necesario
- reducir la carga de trabajo y los costes elevados de mano de obra, medios de cultivo, material de laboratorio
- evitar la lentitud en la introducción e inicio de los cultivos *in vitro*
- aumentar la protección frente a la erosión genética que supondría la pérdida de accesiones en colecciones varietales en situación de riesgo por enfermedades, climatología adversa o accidentes
- aumentar la protección frente a plagas y enfermedades, manteniendo un estado sanitario óptimo
- permitir la conservación cuando por otros métodos no resulta aplicable

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Es por esto que el **objetivo general** de este proyecto es la puesta a punto de un método de conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento lento para una amplia variedad de especies frutales, que se ha de realizar atendiendo al crecimiento de los cultivos durante la conservación en frío, y al crecimiento en su recuperación posterior.

Para la obtención de este objetivo es necesario:

- la optimización de las condiciones luz y/o oscuridad en conservación de crecimiento ralentizado.
- la optimización de un único medio de cultivo para la conservación de la mayor cantidad de especies frutales templadas diferentes.
- la optimización del tiempo de conservación en el mismo medio de cultivo, sin subcultivos
- la optimización del protocolo de recuperación posterior de plantas tras un periodo en condiciones de crecimiento ralentizado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Los 138 clones de frutales que han sido objeto del presente estudio pertenecen a 18 especies diferentes dentro de 8 géneros siendo los más abundantes los del género *Prunus* con 125 clones diferentes.

- **Género *Prunus***

- ***Prunus cerasifera***

Mirobolán 29 C	1 clon
Mirobolán P	1 clon
Mirobolán 605	1 clon
Mirobolán 469	1 clon
Mirobolán 543	1 clon
Mirobolán 743	1 clon
Mirobolán P2175	1 clon
Mirobolán P2980	1 clon
Mirobolán B	1 clon
Adara	1 clon

- ***Prunus cerasifera x munsoniana***

Mariana 2624	3 clones
Mariana GF-8-1	1 clon

- ***Prunus cerasifera x armeniaca***

Híbridos ciruelo por albaricoquero	77 clones
------------------------------------	-----------

- ***Prunus domestica***

Reina Claudia Verde	1 clon
<i>Prunus domestica</i> L.	14 clones

- ***Prunus insititia***

Pollizo de Murcia 25	1 clon
----------------------	--------

- *Prunus cerasus*

Cab 6P 2 clones

- *Prunus avium x pseudocerasus*

Colt 1 clon

- *Prunus persica*

GF 305 1 clon

- *Prunus amygdalus x persica*

Adarcias 2 clones

Adafuel 2 clones

GF 677 1 clon

GXN 22 1 clon

- *Prunus persica. x davidiana*

Nemaguard 1 clon

Cadaman 1 clon

- *Prunus spinosa*

Endrino 6 clones

• Género *Malus*

- *Malus domestica*

Manzano Jork 9 1 clon

Manzano Douce de D'Jerba 1 clon

• Género *Pyrus*

- *Pyrus communis*

Peral 1 clon

• Género *Ficus*

- *Ficus carica*

Napolitana 1 clon

Higuera S4 1 clon

- **Género *Punica***

- *Punica granatum*

Granado	1 clon
---------	--------

- **Género *Cydonia***

- *Cydonia oblonga*

Membrillero BA-29	1 clon
-------------------	--------

Membrillero EM-C	1 clon
------------------	--------

- **Género *Eriobotrya***

- *Eriobotrya japonica*

Níspero Japonés	2 clones
-----------------	----------

- **Género *Crataegus***

- *Crataegus monogyna*

Espino Albar	3 clones
--------------	----------

3.2. MICROPROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se mantuvo en cultivo *in vitro* y se subcultivó cada cuatro semanas en medio de cultivo nuevo. Los subcultivos se llevaron a cabo en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar (Figura 1).

Las operaciones de corte, separación y preparación de los explantos se realizan sobre papel de filtro o bandejas estériles. El instrumental empleado para el manejo de los mismos (pinzas y bisturís) se esteriliza introduciéndolo durante diez segundos en un esterilizador de bolas de vidrio, a 250°C, y se deja enfriar antes de su uso (Figura 2). Es importante mantener las condiciones de asepsia durante todo el proceso para evitar contaminaciones por hongos o bacterias.



Figura 1: Cabina de flujo laminar



Figura 2: Esterilizador de bolas.
Esterilización a 250°C.

Los subcultivos se repitieron cada 4 semanas hasta obtener el número de brotes necesarios para llevar a cabo los experimentos. El medio de cultivo empleado para la multiplicación de los brotes es el de Murashige y Skoog (1962) MS, con Na_2EDTA y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sustituidos por FeEDDHA (Van der Salm, 1994) como quelato altamente estable que proporciona una fuente de hierro fácilmente absorbible, y con la concentración aumentada de tiamina que recomendaron Linsmaier y Skoog (1965).

La composición del medio de cultivo expresado en mg/l podemos verlo en la Tabla 1.



Figura 3: Cámara de cultivo tipo armario.



Figura 4: Cámara de cultivo de grandes
dimensiones.

El material permaneció en la cámara de cultivo (Figura 3 y 4), a una temperatura de 23-25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz a una intensidad de $35\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes cool-white.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo MS utilizado en la multiplicación del material expresado en mg/l.

	Concentración mg/l
NH ₄ NO ₃	1650,00
KNO ₃	1900,00
CaCl ₂ .2 H ₂ O	332,02
MgSO ₄ .7 H ₂ O	180,54
KH ₂ PO ₄	170,00
FeEDDHA	96,00
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Tiamina.HCl	0,40
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina.HCl	0,50
Glicina	2,00
Mío-Inositol	100,00
IBA	0,01
BA	1,00
Sacarosa	3%(p/v)
Agar	0,7%(p/v)
pH	5,5-5,7

3.2.1. ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Para elaborar un litro de medio se siguen los siguientes pasos:

En un vaso de un litro de capacidad, se añade aproximadamente 800ml de agua destilada. El vaso se coloca sobre un agitador magnético, y en el interior del vaso se introduce un imán, de manera que se facilita la distribución de los productos que se van añadiendo (Figura 5).



Figura 5: Elaboración de medio de cultivo.

A continuación con ayuda de una pipeta automática se toman de las soluciones stock las cantidades correspondientes de sales y componentes orgánicos, utilizando una punta de pipeta diferente para cada solución. Los compuestos que se añaden en gran cantidad (sacarosa, mio-inositol...) se pesan en una balanza de precisión y se añaden al medio. Seguidamente se ajusta el volumen con una probeta de un litro, añadiendo agua destilada hasta alcanzar el volumen deseado.

Se mide el pH con un pH-metro y se ajusta hasta alcanzar el pH requerido con ayuda de soluciones de NaOH y ClH de concentración 1N. El medio con el agar disuelto se dispensa en frascos con ayuda de un dispensador (Figura 6).



Figura 6: Aparato dispensador.

Se procede seguidamente a la esterilización del medio en autoclave (Figura 7), durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión. Transcurrido este tiempo y una vez que desciende la presión alcanzada por el autoclave, se dejan enfriar los frascos a temperatura ambiente.



Figura 7: Autoclave para esterilización.

3.3. EL CULTIVO EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO LENTO

Con la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento lento o ralentizado se pretende reducir el crecimiento y mantener el material el mayor tiempo posible sin subcultivos. Esta técnica es usada para mantener colecciones en mínimo crecimiento, por lo que es importante encontrar un protocolo adecuado al mayor número de clones con una duración máxima de tiempo.

La reducción del crecimiento en condiciones *in vitro* se puede lograr disminuyendo en unos grados centígrados la temperatura de la cámara de cultivo, y reduciendo la intensidad o las horas luz, dependiendo de la sensibilidad de la especie. También puede lograrse modificando la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, eliminando o disminuyendo la concentración de los reguladores de crecimiento

o adicionando algún retardadante del crecimiento. El uso de osmoreguladores como la sacarosa, han sido favorables para retardar el desarrollo.

En este trabajo se estudió el efecto de la ausencia (oscuridad) o presencia de luz en el crecimiento lento a una temperatura baja constante de 4°C, así como el efecto de la disminución de sacarosa y de las sales minerales en el medio de cultivo.

No se realizaron tratamientos de pre-acondicionamiento de temperatura para pasar de la cámara de cultivo a 23-25°C con fotoperiodo de 16 horas de luz a una intensidad de 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a las condiciones de cada tratamiento en crecimiento lento a 4°C. Los cultivos permanecieron durante dos semanas, en crecimiento activo (23-25°C con fotoperiodo de 16 h) y después pasaron a la fase de crecimiento ralentizado a 3-4°C de temperatura.

Para la realización de los tratamientos se efectuó el subcultivo de 2 frascos por clon, con 6 brotes en cada uno, siendo un total de 12 brotes por clon.

El control del estado y conservación de las plantas durante el periodo de almacenamiento en crecimiento lento se realizó cada 4 semanas.

Se anotó el porcentaje de supervivencia de los clones, (% de clones vivos al final de cada tratamiento a 4°C respecto al número inicial de clones). Se tomaron además los datos de multiplicación y elongación de los clones.

3.3.1. TRATAMIENTO 1: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses con luz continua.

Este ensayo tiene como objetivo ver el efecto de la luz continua en la conservación de los cultivos en crecimiento lento. Para ello el material permaneció durante un periodo de 7 meses en condiciones de iluminación con luz blanca con un sistema de iluminación LED de 3 vatios (110-150 lm) durante 24 h a 4°C. El medio de cultivo utilizado en este ensayo fue un medio nutritivo basado en el medio MS utilizado para los subcultivos del material descrito con anterioridad (Tabla 1) reduciendo la sacarosa a un 2% (p/v) y que denominaremos MS20.

3.3.2. TRATAMIENTO 2: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses en oscuridad.

Este ensayo se realizó para observar el efecto de la oscuridad en la conservación del material, manteniéndose durante un periodo de 7 meses en condiciones de oscuridad a 4°C en el medio de cultivo MS20 descrito con anterioridad.

3.3.3. TRATAMIENTO 3: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 7 meses en oscuridad.

En este ensayo se modificó el medio de cultivo empleado para la conservación, manteniendo igual el periodo de tiempo en cultivo lento, 7 meses, la oscuridad y la temperatura, 4°C. El medio de cultivo utilizado basado en el medio MS (Tabla1) reduciendo la sacarosa a un 2% (p/v) y los micronutrientes a la mitad de la concentración (50%), y lo denominaremos 1/2MS20.

3.3.4. TRATAMIENTO 4: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 12 meses en oscuridad.

En este ensayo se estudió el crecimiento lento a una temperatura constante de 4°C en oscuridad con gran número de clones de diferentes géneros durante un periodo de 12 meses, incrementando de esta forma el tiempo si comparamos con el Tratamiento 3.

A los 7 meses en condiciones de frío se contabilizan y estudian los resultados (Tratamiento 3) y se reintroducen de nuevo en las condiciones de crecimiento lento sin realizar un nuevo subcultivo hasta que cumplen un periodo total de 12 meses en el mismo medio de cultivo 1/2MS20.

3.3.5. RECUPERACIÓN DEL MATERIAL DESPUÉS DE LA CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO LENTO

La recuperación del material al terminar los distintos tratamientos se inicia con el subcultivo del material en medio MS (Tabla 1) y en condiciones de 23-25°C de temperatura con fotoperiodo de 16 horas a una intensidad de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en la cámara de cultivo. Después de la conservación en frío, se realizaron 3 subcultivos consecutivos en medio MS cada 4 semanas y se evaluó el material.

3.4. ANÁLISIS DE DATOS.

Se tomaron, para todos los tratamientos, datos de multiplicación y elongación de brotes, definiendo la tasa de multiplicación como el número de brotes obtenidos a partir de un brote (número de brotes/brote), y la elongación de los brotes como una variable binaria (“elonga” o “no elonga”) dependiendo de que el brote alcance, al menos, el doble de la longitud inicial (10 mm) y se analizaron los resultados en función de estas dos variables. Los datos de multiplicación se agruparon en categorías, teniendo en cuenta el número de nuevos brotes por brote (Tasa de Multiplicación). Se utilizaron 3 categorías arbitrarias según que la tasa de multiplicación fuera menor de 5 brotes por brotes, entre 5 y 7 o más de 7 brotes por brote. En el caso de clones de los 77 híbridos de ciruelo por albaricoquero por ser un grupo muy numeroso de estudio sólo se utilizaron 2 categorías, según fuera la tasa de multiplicación mayor o menor de 5 brotes por brote.

Se tomaron datos del número de clones vivos al final de cada tratamiento a 4°C respecto al número de clones inicial, expresado como porcentaje de supervivencia de los clones. También se anotaron datos del estado del material para obtener la condición de desarrollo óptimo/normal (estándar), atendiendo a la presencia/ausencia de fisiopatías, necrosis, senescencia, amarilleamiento, pardeamiento, desarrollo de la yema apical y desarrollo anormal de callo basal.

Se evaluó la recuperación de los cultivos con la realización de 3 subcultivos consecutivos cada 4 semanas en medio MS, después de la conservación en frío, para volver al crecimiento *in vitro* activo.

3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el grupo de clones más numeroso (los 77 híbridos de ciruelo por albaricoquero) se realizó un análisis estadístico de la relación entre las variables “tasa de multiplicación > 5” y “elongación de brotes”, ambas con dos categorías, utilizando tablas de contingencia para ver la asociación entre las distribuciones de las dos variables. Se realizaron tests χ^2 (Chi-cuadrado) cuyo cálculo nos permite afirmar con un nivel de confianza determinado si los niveles de una variable cualitativa están asociados a los niveles de la otra variable nominal analizada, es decir, nos permite saber si la tasa de multiplicación de los brotes por encima o no de 5 brotes por brote, es un factor determinante para que dicho brote elongue. Los demás grupos poseen un número de clones pequeño que no aconseja su análisis estadístico.

Para la realización de los análisis se utilizó el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2008)

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. TRATAMIENTO 1: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses con luz continua

En este ensayo el material se conservó en presencia de luz blanca mediante un sistema de iluminación LED de 3 vatios (110-150 lm) durante 24 horas dentro de la cámara a 4°C. El control del estado y conservación de las plantas durante el periodo de almacenamiento en crecimiento lento se inició a las 4 semanas.

En la primera revisión en estas condiciones, se observó una masiva defoliación de los cultivos y un oscurecimiento generalizado de los tejidos que empeoró con el tiempo, por lo que las siguientes revisiones se realizaron una vez a la semana.

Tras 2 revisiones más, es decir a los 2 meses y medio desde el inicio del ensayo, se finalizó debido al mal aspecto de los cultivos y al peligro de perder el material.

4.2. TRATAMIENTO 2: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo MS20 durante 7 meses en oscuridad.

El material se mantuvo en oscuridad y a 4°C durante 7 meses con revisiones cada 4 semanas. Después de siete meses se observó que todo el material de nuevo crecimiento estaba etiolado debido a la ausencia de luz.

Se tomaron datos de multiplicación y de elongación al finalizar el tratamiento. Los resultados se muestran separadamente según los géneros. En el caso del género *Prunus*, el estudio se hará también por especies ya que es un grupo amplio y diverso con un total de 125 clones.

4.2.1. Género *Prunus*.

- *Prunus cerasifera* (10 clones).

Los resultados muestran que en todos los clones que presentan una tasa de multiplicación superior a 5, los brotes elongan, a excepción del Mirobolán 29C que presenta una buena multiplicación, pero los brotes no están elongados (Tabla 2). El 36% de los clones presentan bajas tasas de multiplicación (<5 brotes por brote) como el Mirobolán 743, Mirobolán B, Mirobolán P y Adara. Mientras que el 45,5 % de los clones destaca por su elevada tasa de multiplicación (>7 brotes por brote) (Figura 8). Se observa que cuando los brotes multiplican con tasa inferior a 5 tampoco elongan.

Tabla 2: *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

MS20	Multiplicación	Elongación
Mirobolán 29C	XXX	—
Mirobolán 748	XXX	+
Mirobolán 469	XXX	+
Mirobolán 543	XX	+
Mirobolán 605	XXX	+
Mirobolán 743	X	-
Mirobolán P2175	XX	+
Mirobolán P2980	XXX	+
Mirobolán B	X	-
Mirobolán P	X	-
Adara	X	-

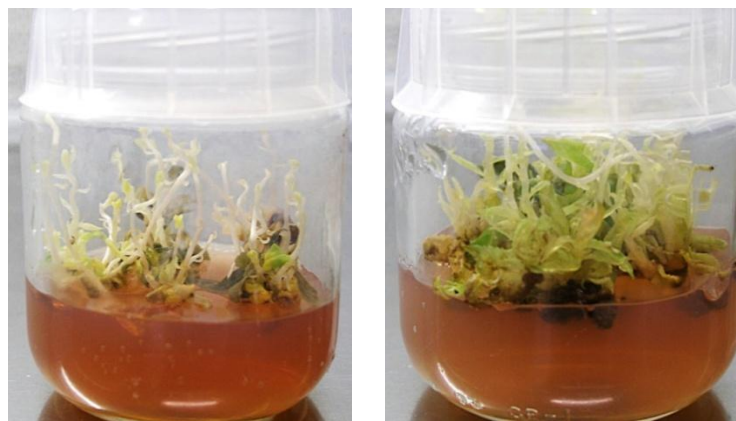


Figura 8: Mirobolán P2980 (izquierda) y Mirobolán 605 (derecha) ambos de la especie *Prunus cerasifera* con tasa de multiplicación mayor de 7 y brotes elongados en el Tratamiento 2.

La tasa de multiplicación obtenida presenta grandes diferencias entre los clones (Figura 9), siendo máxima para el Mirobolán 748 con una tasa de 10,2 brotes por brote, y mínima para Mirobolán P, Mirobolán 743 y Mirobolán B con tasas de multiplicación entre 0,5 y 1,4. En el caso de Adara su tasa de multiplicación también está por debajo de 5 (Figura 10).

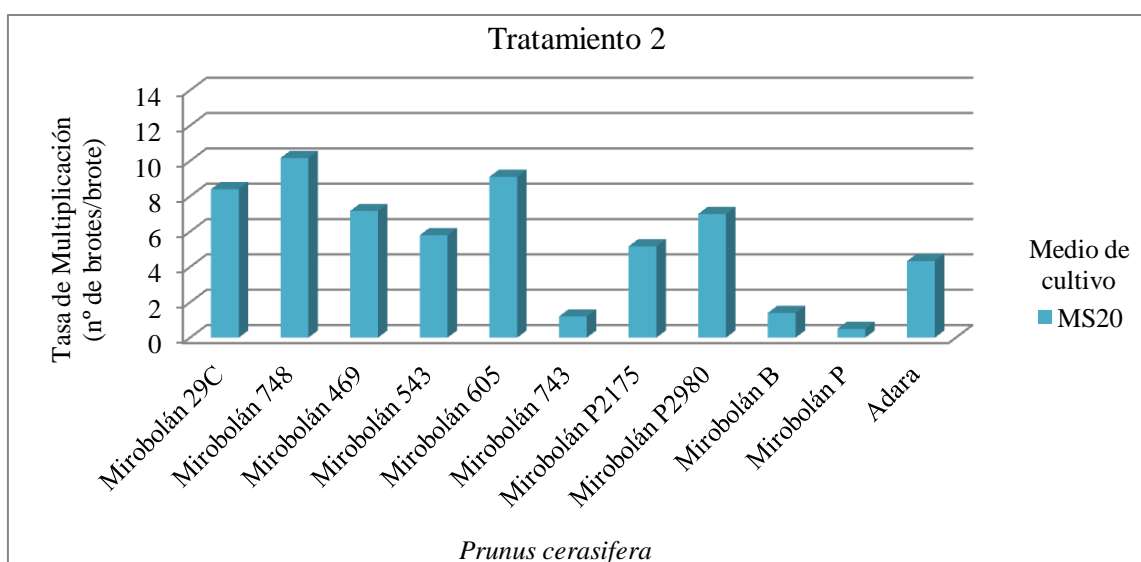


Figura 9: Tasa de multiplicación de los clones de *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 2.



Figura 10: Mirobolán 743 (izquierda) y Adara (derecha) ambos de la especie *Prunus cerasifera* con tasa de multiplicación menor de 5 y brotes no elongados en el Tratamiento 2.

- *Prunus cerasifera x munsoniana* (4 clones).

En todos los clones de Mariana el material multiplica por encima de 5 brotes por brote, y sólo Mariana P, multiplica pero no elonga, es decir, los brotes no crecen en altura (Tabla 3). La tasa de multiplicación llega a 12 en el clon de Mariana 2624-11 con buen aspecto (Figuras 11 y 12). La menor tasa de multiplicación corresponde a Mariana P con 5,8.



Figura 11: Mariana 2624-11 perteneciente a *Prunus cerasifera x munsoniana* con brotes elongados y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote tras el Tratamiento 2.

Tabla 3: *Prunus cerasifera x munsoniana* en el tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

MS20	Multiplicación	Elongación
Mariana 2624-11	XXX	+
Mariana 2624-12	XXX	+
Mariana P	XX	-
Mariana GF 81	XXX	+

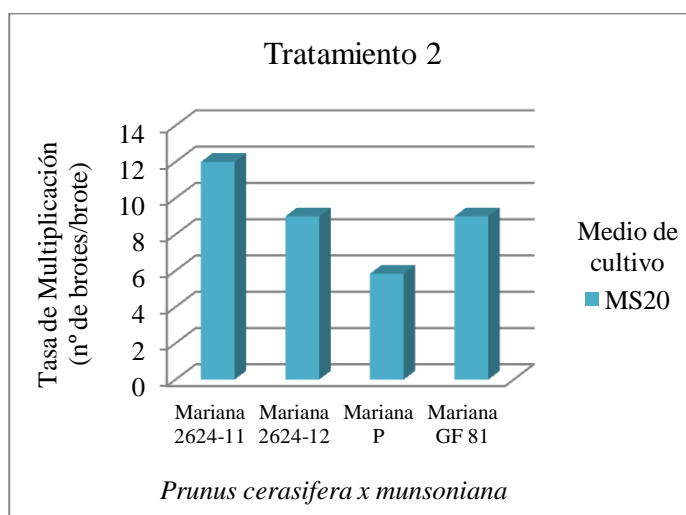


Figura 12: Tasa de multiplicación de *P. cerasifera x munsoniana* en el Tratamiento 2.

- *Prunus cerasifera x armeniaca* (77 clones).

Al ser un grupo numeroso de clones, se realizó un análisis estadístico de la relación entre las variables cualitativas de multiplicación y elongación. Utilizamos una tabla de contingencia para estudiar la distribución conjunta de las dos variables (Tabla 4).

El análisis de la relación de dependencia entre variables cualitativas utiliza un contraste estadístico basado en el estadístico χ^2 (Chi-cuadrado), cuyo cálculo nos permite afirmar con un nivel de confianza determinado si los niveles de una variable cualitativa están asociados a los niveles de la otra variable nominal analizada, en este caso nos permite saber si la tasa de multiplicación de los brotes por encima o no de 5 brotes por brote, es un factor determinante para que dicho brote elongue.

Podemos observar en la columna de la derecha y en la fila inferior de la Tabla 4 las frecuencias marginales de estas 2 variables.

Para los 77 clones de *Prunus cerasifera x armeniaca* en el tratamiento 2 y con el medio de cultivo MS20 los resultados obtenidos muestran una falta de asociación entre las variables elongación y multiplicación, como muestra el valor de la χ^2 , que con 1 grado de libertad no cae en la región de rechazo con una probabilidad alta de $p=0,2031$ de forma que las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas y las variables son independientes.

Tabla 4: Tabla de Contingencia entre multiplicación y elongación de los brotes de *Prunus cerasifera x armeniaca* (Tratamiento 2) con el valor de χ^2 y su probabilidad de error p .

MS20	Elongación	No elongación	Total
Multiplicación<5	7	18	25
Multiplicación>5	24	28	52
Total	31	46	77
$\chi^2=1,6202$			
$p=0,2031$ (n.s.)			

La Figura 13 muestra el aspecto de los brotes cultivados en el medio MS20, elongados y con baja tasa de multiplicación.



Figura 13: Clon número 65 perteneciente a *Prunus cerasifera x armeniaca* con brotes elongados y tasa de multiplicación menor de 5 brotes por brote después del Tratamiento 2.

- *Prunus domestica* (15 clones).

Entre los ciruelos *P. domestica* observamos que 12 de los 15 clones multiplicaron por encima de 5 brotes por brote, lo que supone un 80% del material (Tabla 5). De ese 80%, el 83% de los clones también elongaron. El 20% restante que presentó una multiplicación por debajo de 5 brotes por brote, no elongaron. Además, el 26,7% de los clones multiplicó con una tasa superior a 7 brotes por brote.

De estos clones se observa que la tasa de multiplicación de la ciruela Reina Claudia Verde (denominada clon Ciruelo-1) fue de 10,8 brotes por brote y los brotes habían elongado (Figura 14).



Figura 14: Reina Claudia Verde (Ciruelo-1), clon de *Prunus domestica*, con una tasa de multiplicación mayor que 7 y elongación de los brotes tras el Tratamiento 2.

Tabla 5: *Prunus domestica* en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

MS20	Multiplicación	Elongación
Ciruelo-1	XXX	+
Ciruelo-2	XX	-
Ciruelo-3	XX	+
Ciruelo-4	XX	+
Ciruelo-5	XX	+
Ciruelo-6	XX	-
Ciruelo-7	XX	+
Ciruelo-8	XX	+
Ciruelo-9	X	-
Ciruelo-10	X	-
Ciruelo-11	X	-
Ciruelo-12	XX	+
Ciruelo-13	XXX	+
Ciruelo-14	XXX	+
Ciruelo-15	XXX	+

- *Prunus insititia* (1 clon).

En esta especie se estudió un el clon Pollizo 25.

La tasa de multiplicación fue alta, 7,5 brotes por brote y los brotes elongaron durante este periodo de tiempo (7 meses) presentado muy buen estado (Figura 15).



Figura 15: Pollizo 25, clon de *Prunus insititia* con una tasa de multiplicación mayor que 7 y brotes elongados después del Tratamiento 2.

- Cerezos: *Prunus cerasus* (2 clones) y *Prunus avium* x *pseudocerasus* (1 clon).

Tras el Tratamiento 2 todos los clones sin excepción multiplicaron con una tasa superior a 7 (Tabla 6), entre 7 -8 brotes, y sus brotes elongaron (Figuras 16 y 17).

Tabla 6: *Prunus cerasus* (Cab) y *P. avium* x *pseudocerasus* (Colt) en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

MS20	Multiplicación	Elongación
Cab 6P	XXX	+
Cab P	XXX	+
Colt	XXX	+

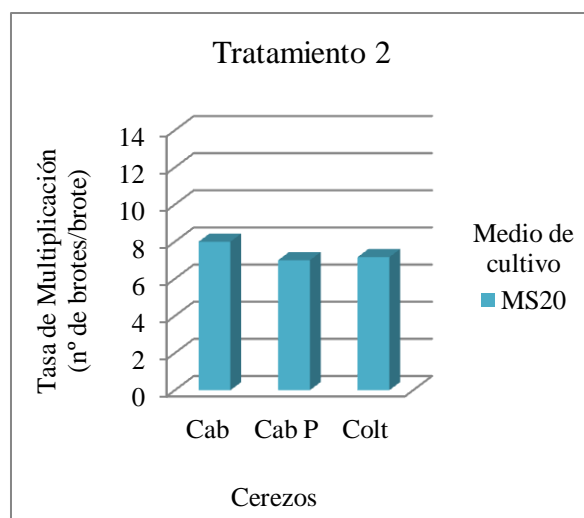


Figura 16: Tasa de multiplicación de *Prunus cerasus* y *P. avium x pseudocerasus* en el Tratamiento 2.



Figura 17: Cab P (izquierda) y Cab 6P (derecha) ambos clones de *Prunus cerasus* con una tasa de multiplicación de 7 y brotes elongados después del Tratamiento 2.

- Melocotonero e híbridos: *Prunus persica* (1 clon), *Prunus amygdalus x persica* (6 clones) y *Prunus persica x davidiana* (2 clones).

En este grupo el clon Cadaman (*Prunus persica x davidiana*) murió tras un periodo de 4 meses en las condiciones del Tratamiento 2.

Los resultados obtenidos en este grupo (Tabla 7) muestran el clon Adafuel 0 como el único que multiplicó por encima de la tasa de 5, lo que representa un 12,5% del total de clones. El 75% de los clones multiplicaron por debajo de la tasa de 5, pero elongaron, a excepción de los clones GF305 y Adarcias 0 (Figura 18). Cadaman no se adaptó a las condiciones del Tratamiento 2.

Tabla 7: *Prunus persica*, *P. amygdalus x persica* y *P. persica x davidiana* en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

MS20	Multiplicación	Elongación
GF305	X	-
Adarcias 0	X	-
Adarcias 7	X	+
Adafuel	X	+
Adafuel 0	XX	+
GF 677	X	+
G x N 22	X	+
Nemaguard	X	+
Cadaman	----	----

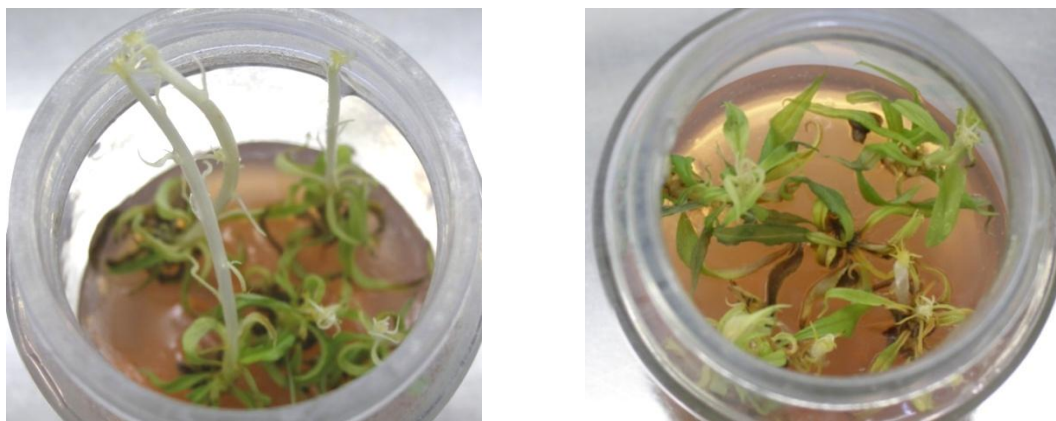


Figura 18: Nemaguard (*Prunus persica x davidiana*) (izquierda) con elongación de brotes y Adarcias 0 (*Prunus amygdalus x persica*) (derecha) sin elongación de brotes, ambos con tasa inferior a 5 en el Tratamiento 2.

Las tasas de multiplicación dentro del grupo variaron entre 6 brotes para Adafuel 0, y 1 brote para el melocotonero (*Prunus persica*), es decir no presentó multiplicación al crecer en estas condiciones (Figura 19).

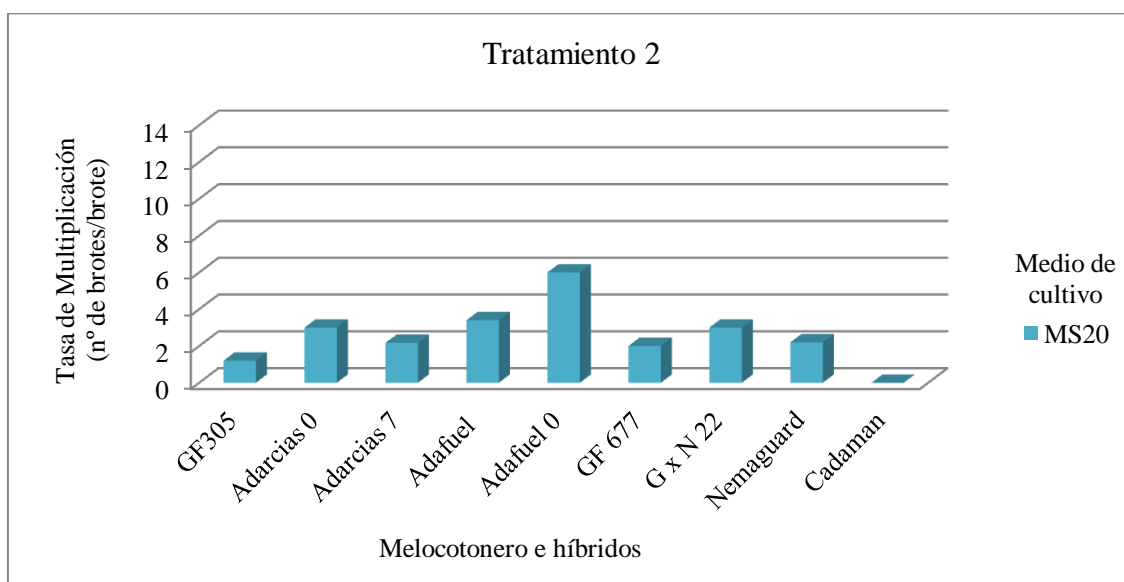


Figura 19: Tasas de multiplicación de *Prunus persica*, *Prunus amygdalus x persica* y *Prunus persica x davidiana* en el Tratamiento 2.

- *Prunus spinosa* (6 clones).

Se observa que cuatro de los seis clones obtienen una alta tasa de multiplicación (superior a 7) y también hay elongación de los brotes. Los dos clones que multiplican poco no presentan elongación de los brotes (Tabla 8).

Tabla 8: *Prunus spinosa* en el Tratamiento 2. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

MS20	Multiplicación	Elongación
Endrino 1	X	-
Endrino 2	XXX	+
Endrino 3	XXX	+
Endrino 4	X	-
Endrino 5	XXX	+
Endrino 6	XXX	+

El 66,7% de los clones multiplica con una tasa superior a 10 (Figura 20) siendo los de mayor tasa, 12 brotes por brote, los clones Endrino 5 y 6 (Figura 21). Dos clones de *P. spinosa* presentan una tasa inferior a 5: Endrino 1 y 4 presentan una tasa entre 3,5 y 3,8.

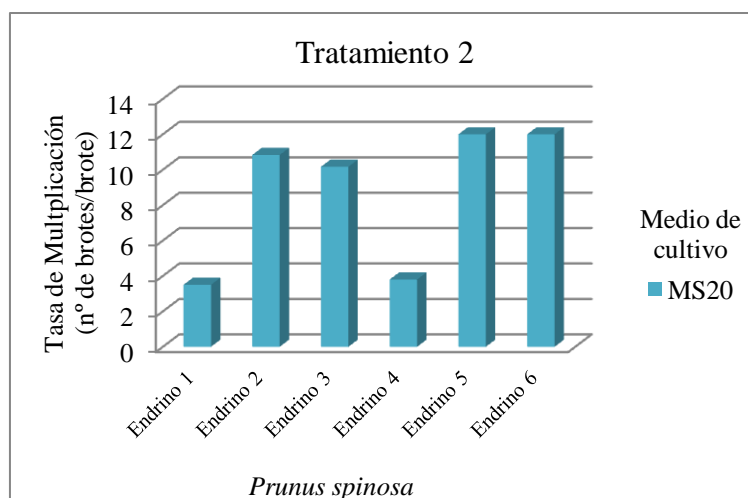


Figura 20: Tasa de multiplicación de *Prunus spinosa* en el Tratamiento 2.



Figura 21: Endrino 6 (*Prunus spinosa*) con elongación de brotes y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote en el Tratamiento 2.

4.2.2. Género *Malus*: *Malus domestica* (2 clones).

En los dos clones estudiados hay elongación. Sin embargo existen diferencias entre estos dos clones en cuanto a la multiplicación; la tasa de multiplicación para manzano Jork 9 fue de 2 y de 4,8 brotes para Douce D´Jerba, más del doble. El aspecto de los 2 clones al salir del crecimiento lento es bueno (Figura 22).



Figura 22: Manzano Jork 9 (izquierda) con tasa de multiplicación de 2 y Douce D'Jerba (derecha) con tasa de 4,8. Ambos del género *Malus* con elongación de los brotes en el Tratamiento 2.

4.2.3. Género *Pyrus*: *Pyrus communis* (1 clon).

El único clon del género *Pyrus*, sobrevive en buen estado. Aunque este cultivo multiplica poco, la elongación de sus brotes es muy elevada (Figura 23).

Para este clon de peral se obtiene una tasa de multiplicación de 2,5 brotes por brote en las condiciones del Tratamiento 2.



Figura 23: Peral perteneciente al género *Pyrus* con brotes elongados y tasa de multiplicación por debajo de 5 brotes por brote en el Tratamiento 2.

4.2.4. Género *Ficus*: *Ficus carica* (2 clones).

Del género *Ficus* sólo sobrevive uno de los dos clones estudiados. El otro muere antes de completar el periodo de 7 meses. El clon superviviente, Higuera S4, multiplica bien en estas condiciones llegando a una tasa de 5 y presenta elongación de los brotes (Figura 24).



Figura 24: Higuera S4 (género *Ficus*) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación 5 brotes por brote en el Tratamiento 2.

4.2.5. Género *Punica*: *Punica granatum* (1 clon).

De este género estudiamos un clon que murió a los 4 meses de cultivo en estas condiciones.

4.2.6. Género *Cydonia*: *Cydonia oblonga* (2 clones).

En este género encontramos similitudes entre sus dos clones ya que ambos multiplican poco (<5 brotes por brote) y la elongación de sus brotes es la máxima observada entre todos los clones (Figura 25).



Figura 25: Membrillero BA 29 (género *Cydonia*) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación inferior a 5 brotes por brote tras el Tratamiento 2.

Sus tasas de multiplicación son similares 1,5-1,6 en ambos clones y aunque sean tasas de multiplicación bajas, su aspecto es excelente.

4.2.7. Género *Eriobotrya*: *Eriobotrya japonica* (2 clones).

En este género ambos clones presentan la misma respuesta a las condiciones del Tratamiento 2, multiplican poco (tasa <5) y hay elongación de sus brotes (Figura 26).

Es un material difícil de cultivar *in vitro*, y que en crecimiento activo multiplica muy poco, lo que se aprecia también en el crecimiento ralentizado. Alguno de sus brotes incluso muere en estas condiciones. La tasa de multiplicación se sitúa entre 0,8 y 1,1.



Figura 26: Clon 1 de Níspero japonés (género *Eriobotrya*) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación inferior a 5 brotes por brote en el Tratamiento 2.

4.2.8. Género *Crataegus*: *Crataegus monogyna* (3 clones).

Los tres clones de éste género presentaron resultados similares en estas condiciones: multiplican muy poco, algunos brotes mueren (Figura 27), y la elongación de sus brotes es muy elevada. La tasa de multiplicación está entre 1,4 y 1,1 brotes por brote.



Figura 27: Género *Crataegus* con tasa de multiplicación menor de 5 brotes por brote, elongación de los brotes y brotes muertos en el Tratamiento 2.

4.3. TRATAMIENTO 3: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 7 meses en oscuridad.

En este tercer tratamiento la conservación de las plantas se realizó durante 7 meses de almacenamiento en crecimiento lento en oscuridad, el medio utilizado fue 1/2MS20 y se realizó una revisión del material cada 4 semanas.

Los resultados de los cultivos en el caso del género *Prunus* se analizarán atendiendo a sus diferentes especies por ser el grupo mayor y más diverso (125 clones). Para el resto del material los resultados se expondrán según los diferentes géneros. Se tomaron datos de multiplicación y elongación de los cultivos tras 7 meses en las condiciones del Tratamiento 3.

4.3.1. Género *Prunus*.

- *Prunus cerasifera* (10 clones).

Observamos que a excepción del Mirobolán B que multiplica poco (Tabla 9), todos los demás multiplican por encima de 5 brotes por brote. Además el 45,5% de los clones: Mirobolán 29C, Mirobolán 748, Mirobolán 469, Mirobolán 605 (Figuras 28 y 29) y Mirobolán P, multiplican mucho en estas condiciones. Con respecto a la elongación cabe destacar que cuatro clones: Mirobolán 29C, Mirobolán P2980, Mirobolán B y Mirobolán P no elongan, lo que supone el 36,4% del total.

La tasa de multiplicación que se obtiene al finalizar el Tratamiento 3, presenta grandes diferencias en este grupo (Figura 30), siendo la tasa de multiplicación más alta para el Mirobolán 748 con 13 brotes por brote y la más baja para Mirobolán B con una tasa de multiplicación de 3,7. Se supera el 5 en la tasa de multiplicación para todos los clones excepto para Mirobolán B.

Tabla 9: *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Mirobolán 29C	XXX	-
Mirobolán 748	XXX	+
Mirobolán 469	XXX	+
Mirobolán 543	XX	+
Mirobolán 605	XXX	+
Mirobolán 743	XX	+
Mirobolán P2175	XX	+
Mirobolán P2980	XX	-
Mirobolán B	X	-
Mirobolán P	XXX	-
Adara	XX	+



Figura 28: Mirobolán B (*Prunus cerasifera*) sin elongación de los brotes y con una tasa de multiplicación por debajo de 5 brotes por brote tras el Tratamiento 3.



Figura 29: Mirobolán 743 (izquierda) cuya tasa de multiplicación está entre 5-7 y Mirobolán 605 (derecha) cuya tasa de multiplicación es mayor de 7, ambos con elongación de sus brotes pertenecientes a *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 3.

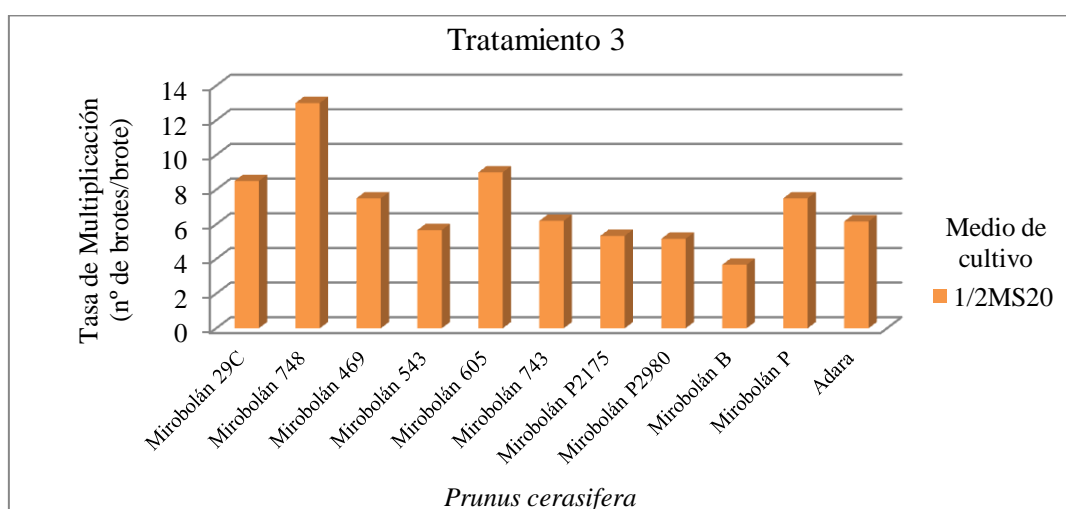


Figura 30: Tasa de multiplicación de *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 3.

- *Prunus cerasifera* x *munsoniana* (4 clones).

En todos los casos el material multiplica por encima de 5 brotes por brote, excepto en Mariana 2624-11, que multiplica por debajo de la tasa de 5 y no hay elongación de sus brotes (Tabla 10). Sólo en 1 de los 3 clones que multiplican por encima de 5, Mariana P, no existe elongación de sus brotes.

Tabla 10: *Prunus cerasifera x munsoniana* en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Mariana 2624-11	X	-
Mariana 2624-12	XXX	+
Mariana GF 81	XXX	+
Mariana P	XXX	-

El 75% de los clones superan una tasa de multiplicación de 8 (Figura 31), siendo la máxima de 9,2 para Mariana 2624-12. Sin embargo destaca la baja tasa de multiplicación del clon Mariana 2624-11, que es de 3,6 (Figura 32). Estos dos clones de Mariana 2624 de diferente origen presentan un comportamiento muy diferente en el Tratamiento 3.

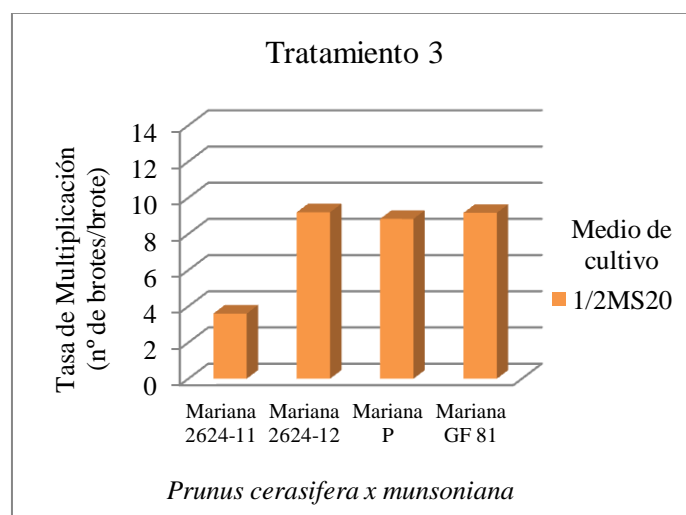


Figura 31: Tasa de multiplicación *Prunus cerasifera x munsoniana* en el Tratamiento 3.

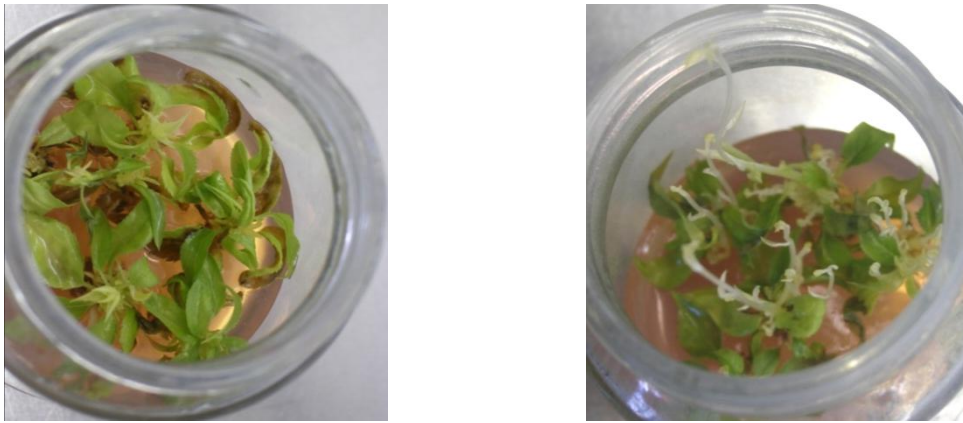


Figura 32: Mariana 2624-11 (izquierda) sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación inferior a 5 y Mariana 2624-12 (derecha) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación superior a 5 ambos pertenecientes a *Prunus cerasifera x munsoniana* tras el Tratamiento 3.

- *Prunus cerasifera x armeniaca* (77 clones).

Al ser un número elevado de clones, se realiza un análisis estadístico de los resultados del Tratamiento 3, estudiando la relación entre dos variables cualitativas diferentes, multiplicación y elongación. Utilizamos las tablas de contingencia para expresar la relación entre las dos variables (Tabla 11).

Para los 77 clones de *Prunus cerasifera x armeniaca* en el Tratamiento 3 y con el medio de cultivo 1/2MS20 podemos ver en la columna de la derecha y en la fila inferior de la Tabla 12 las frecuencias marginales de estas 2 variables

La relación de dependencia entre variables cualitativas utiliza un contraste estadístico basado en el estadístico χ^2 (Chi-cuadrado), cuyo cálculo nos permite afirmar con un nivel de confianza determinado si los niveles de una variable cualitativa están asociados a los niveles de la otra variable nominal analizada, es decir, nos permite saber si la tasa de multiplicación de los brotes por encima o no de 5 brotes por brote, es un factor determinante para que dicho brote elongue.

Tabla 11: Tabla de Contingencia entre multiplicación y elongación de los brotes de *Prunus cerasifera x armeniaca* (Tratamiento 3) con el valor de χ^2 y su probabilidad de error p .

1/2MS20	Elongación	No elongación	Total
Multiplicación <5	0	16	16
Multiplicación >5	43	18	61
Total	43	34	77
$\chi^2=22,7642$			
$p=1,831*10^{-6}$			
(***)			

Con el medio de cultivo 1/2MS20 los resultados obtenidos muestran una fuerte asociación de la tasa de multiplicación (menor o mayor que 5) con la elongación, o no, de los brotes, con una $\chi^2=22,7642$, que para 1 grado de libertad, hace aceptar la hipótesis de que las diferencias entre las frecuencias son estadísticamente significativas y no debidas al azar, con una probabilidad de error muy pequeña $p=1,831*10^{-6}$. Es decir, los brotes que tienen una tasa de multiplicación mayor que 5 presentan elongación, mientras que los brotes que presentan una tasa de multiplicación menor que 5 no elongan. Las variables ‘tasa de multiplicación’ y ‘elongación’ son dependientes con un grado de asociación muy significativo.

La Figura 33 muestra el aspecto de los brotes cultivados en el medio de cultivo 1/2MS20, elongados y con alta o baja tasa de multiplicación.



Figura 33: Clon número 72 (izquierda) con brotes elongados y baja tasa de multiplicación y clon 53 (derecha) con brotes elongados y elevada multiplicación, ambos clones de *Prunus cerasifera x armeniaca* al salir del Tratamiento 3.

- *Prunus domestica* (15 clones).

En el 80 % del material estudiado, 12 de los 15 clones, la tasa de multiplicación se encuentra por encima de 5. En 11 de los 12 casos donde la multiplicación es elevada, también hay elongación de sus brotes. Sólo 1 de los clones que multiplican con tasa superior a 5 no elonga. Además, los 3 clones que no multiplican mucho en este medio (tasa de multiplicación inferior a 5), tampoco elongan (Tabla 12).

La tasa de multiplicación de la ciruela Reina Claudia Verde (clon ciruelo-1) fue de 10,8 brotes por brote y se produce la elongación de sus brotes a lo largo del tratamiento (Figura 34).

Tabla 12: *Prunus domestica* en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Ciruelo-1	XXX	+
Ciruelo-2	XX	-
Ciruelo-3	XX	+
Ciruelo-4	XX	+
Ciruelo-5	XX	+
Ciruelo-6	XX	-
Ciruelo-7	XX	+
Ciruelo-8	X	+
Ciruelo-9	X	-
Ciruelo-10	XX	-
Ciruelo-11	X	-
Ciruelo-12	XX	+
Ciruelo-13	XXX	+
Ciruelo-14	XX	+
Ciruelo-15	XXX	+



Figura 34: Reina Claudia Verde (clon ciruelo-1) de *Prunus domestica* con elongación de los brotes y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote en el Tratamiento 3.

- *Prunus insititia* (1 clon).

Este clon responde bien a las condiciones de crecimiento lento en este tratamiento. Su tasa de multiplicación es de 8 y la elongación de sus brotes es elevada (Figura 35).



Figura 35: Pollizo 25 perteneciente a *Prunus insititia* con elongación de los brotes y tasa de multiplicación mayor de 7 brotes por brote en el Tratamiento 3.

- Cerezos: *Prunus cerasus* (2 clones) y *Prunus avium* x *pseudocerasus* (1 clon).

En el grupo de cerezos observamos que todos multiplican con tasas elevadas en este medio de cultivo (1/2MS20) y a su vez elongan, sin excepción (Tabla 13).

Comparando la tasa de multiplicación de estos clones, observamos que esta tasa no baja del 6 de promedio (Figura 36 y 37). La tasa más alta corresponde a Cab 6P con 8,2 brotes por brote

Tabla 13: *Prunus cerasus* y *Prunus avium* x *pseudocerasus* en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Cab 6P	XXX	+
Cab P	XX	+
Colt	XXX	+

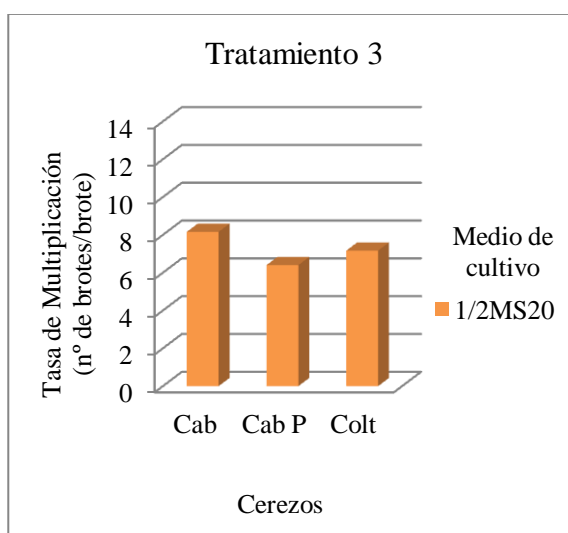


Figura 36: Tasa de multiplicación de *Prunus cerasus* y *Prunus avium* x *pseudocerasus* en el Tratamiento 3.



Figura 37: Colt perteneciente a *Prunus avium x pseudocerasus* con elongación de los brotes y tasa de multiplicación superior a 7 brotes por brote en el tratamiento 3.

- Melocotonero e híbridos: *Prunus persica* (1 clon), *Prunus amygdalus x persica* (6 clones) y *Prunus persica x davidiana* (2 clones).

Cadaman se ve afectado por la baja temperatura del crecimiento lento hasta el punto de morir al cabo de 4 meses. En este grupo de melocotonero y sus híbridos observamos que el 37,5% de los clones: Adarcias 0, Adafuel 0 y GxN 22 (Figura 38), multiplican con una tasa superior a 5 brotes por brote. Los 3 clones que multiplican con tasas superiores no presentan sin embargo elongación en los brotes. Los clones que presentan elongación en los brotes son Adarcias 7 y GF677 que suponen un 25% del material, y son precisamente clones con baja tasa de multiplicación (Tabla 14).

Comparando las tasas de multiplicación de los híbridos: *Prunus amygdalus x persica* y *Prunus persica x davidiana*, con melocotonero (*Prunus persica*) (Figura 38), destacan los híbridos Adarcias 0 con una tasa de multiplicación de 4,6, Adafuel 0 con una tasa de 6 y GxN 22 con la mayor tasa de todos de 7,5 brotes por brote. La tasa más baja la observamos en GF305 con tasa 1,3 (Figura 39) aunque también es bastante baja la del clon denominado Adafuel con 1,6 brotes por brote.

Tabla 14: *Prunus persica*, *Prunus amygdalus x persica* y *Prunus persica x davidiana* en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X

para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
GF305	X	-
Adarcias 0	XX	-
Adarcias 7	X	+
Adafuel	X	-
Adafuel 0	XX	-
GF 677	X	+
G x N 22	XXX	-
Nemaguard	X	-
Cadaman	----	----

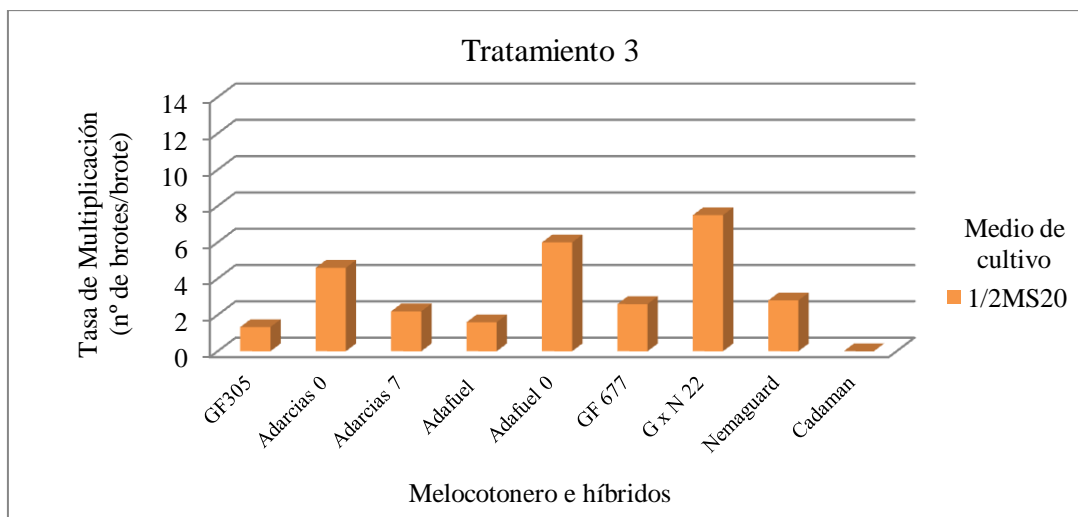


Figura 38: Tasa de multiplicación de los clones de *Prunus persica*, *Prunus amygdalus x persica* y *Prunus persica x davidiana* en el Tratamiento 3.



Figura 39: Adarcias 0 (*Prunus amygdalus x persica*) (izquierda) con tasa superior a 5 y GF 305 (*Prunus persica*) (derecha) con tasa inferior a 5 brotes por brote, ambos sin elongación de los brotes en el Tratamiento 3.

- *Prunus spinosa* (6 clones).

Estudiando la multiplicación y elongación de estos clones tras el tratamiento 3, se observa que en los 2 clones que multiplican con una tasa de multiplicación superior a 5, también existe elongación de sus brotes (Tabla 15). De la misma forma todos los que multiplican por debajo de esa tasa no elongan, a excepción de 1 clon, Endrino 6 que multiplica poco (<5 brotes por brote) pero sus brotes elongan (Figura 40).



Figura 40: Endrino 6 perteneciente a *Prunus spinosa* con elongación de los brotes y multiplicación inferior a 5 brotes por brote en el Tratamiento 3.

Tabla 15: *Prunus spinosa* en el Tratamiento 3. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Endrino 1	X	-
Endrino 2	X	-
Endrino 3	X	-
Endrino 4	XXX	+
Endrino 5	XXX	+
Endrino 6	X	+

Los diferentes clones de endrino presenta notables diferencias con respecto a su tasa de multiplicación en este ensayo (Figura 41). Mientras que el 33,3% de los clones (2 clones) multiplica con una tasa superior a 10 brotes por brote, siendo la más elevada la de Endrino 5 con 12,2 brotes. El otro 66,7% de los clones (4 clones) lo hacen entre un 3,2 y 3,8 de tasa de multiplicación.

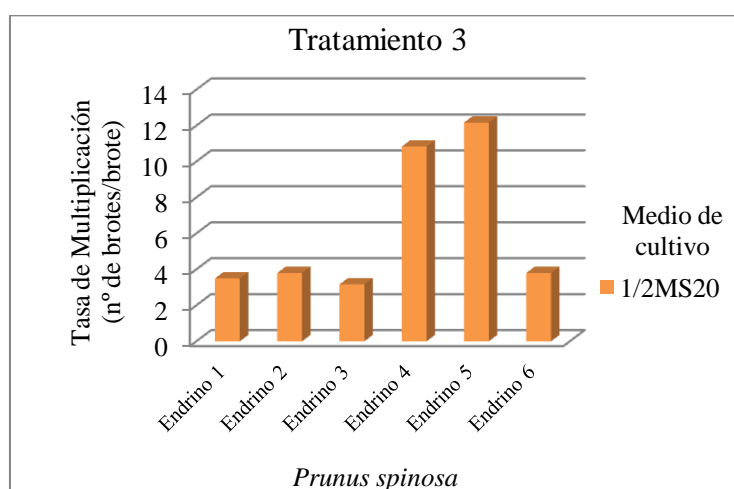


Figura 41: Tasa de multiplicación de *Prunus spinosa* en el Tratamiento 3.

4.3.2. Género *Malus*: *Malus domestica* (2 clones).

El manzano Douce D'Jerba multiplica por encima de 5 (5,2) y existe elongación de los brotes, sin embargo el manzano Jork 9 multiplica menos (tasa 3,8) aunque existe también elongación de brotes (Figura 42).

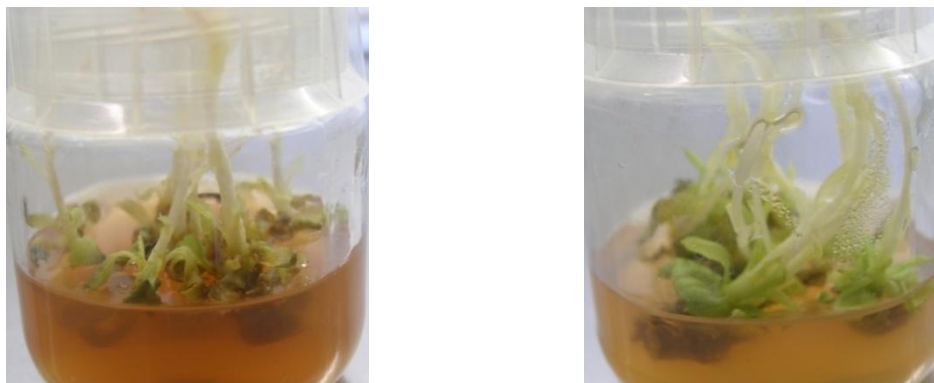


Figura 42: Manzano Jork 9 (izquierda) con tasa de multiplicación 3,8 y Douce D'Jerba (derecha) con tasa 5,2 brotes por brote, ambos del género *Malus* con elongación de sus brotes en el Tratamiento 3.

4.3.3. Género *Pyrus*: *Pyrus communis* (1 clon).

El clon estudiado de este género presenta muy buen estado al finalizar el Tratamiento 3. Aunque este cultivo multiplica poco, la elongación de sus brotes es máxima llegando al borde superior del recipiente de cultivo (Figura 43). Para peral se obtiene una tasa de multiplicación de 3 en las condiciones del Tratamiento 3.



Figura 43: Varios brotes de peral (género *Pyrus*) elongados por encima del tamaño del recipiente de cultivo que lo contenía tras el Tratamiento 3.

4.3.4. Género *Ficus*: *Ficus carica* (2 clones).

Los 2 clones de higuera multiplican por debajo de 5 brotes por brote y no hay elongación de los brotes (Figura 44). La baja tasa de multiplicación fue de 1,4 para el clon Higuera S4 y 1,6 brotes por brote para el clon Napolitana.



Figura 44: Higuera S4 (género *Ficus*) con tasa de multiplicación 1,4 brotes por brote y sin elongación de los brotes tras el Tratamiento 3.

4.3.5. Género *Punica*: *Punica granatum* (1 clon).

El clon de granado murió antes de transcurrir los 7 meses del periodo del ensayo.

4.3.6. Género *Cydonia*: *Cydonia oblonga* (2 clones).

En este género encontramos similitudes entre sus dos clones, ambos multiplican por debajo de 5 brotes por brote y existe elongación elevada de los brotes. Sin embargo, la tasa de multiplicación del membrillero EM-C es prácticamente el doble que la del membrillero BA 29 ya que su tasa de multiplicación es de 3,4 frente al 1,8 brotes por brote del membrillero BA29 (Figura 45).



Figura 45: Membrillero EM-C (izquierda) con tasa de multiplicación 3,4 y membrillero BA 29 (derecha) con tasa de multiplicación 1,8 brotes por brote, ambos con elongación de los brotes tras el Tratamiento 3.

4.3.7. Género *Eriobotrya*: *Eriobotrya japonica* (2 clones).

En este género ambos clones presentan similar apariencia con escasa multiplicación (<5 brotes por brote) y falta de elongación de sus brotes (Figura 46).



Figura 46: Níspero japonés 2 (género *Eriobotrya*) sin elongación de los brotes en el Tratamiento 3.

Es un material difícil de cultivar *in vitro* y en crecimiento activo multiplica muy poco; en este ensayo alguno de los brotes de estos clones incluso muere durante el experimento. Es un material que también tiene baja tasa de multiplicación en el Tratamiento 3. La tasa de multiplicación en el género *Eriobotrya* está entre los valores de 1 para el clon Níspero japonés 1 y 1,75 brotes por brote para Níspero japonés 2.

4.3.8. Género *Crataegus*: *Crataegus monogyna* (3 clones).

Los tres clones reaccionan de la misma manera: sus brotes multiplican mucho y la elongación de los brotes supera el tamaño del envase de cultivo que los contiene. La tasa de multiplicación es elevada y está en torno a los 12-14 brotes por brote en los tres clones para este tratamiento (Figuras 47 y 48).



Figura 47: Espino albar 1 perteneciente al género *Crataegus* con elongación de los brotes tras el Tratamiento 3.

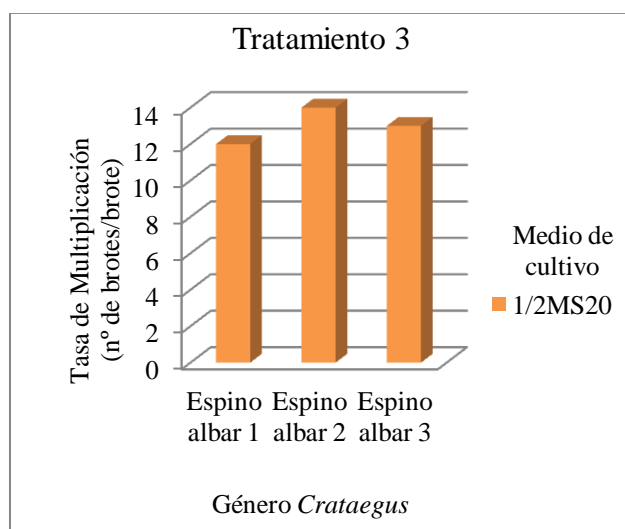


Figura 48: Tasa de multiplicación de los clones del género *Crataegus* en Tratamiento 3.

4.4. TRATAMIENTO 4: Crecimiento ralentizado a 4°C en medio de cultivo 1/2MS20 durante 12 meses en oscuridad.

En este ensayo se planteó alargar el periodo de tiempo hasta alcanzar 12 meses en las condiciones del tratamiento 3 dados los resultados tras 7 meses de cultivo en crecimiento ralentizado a 4°C en medio 1/2MS20 y oscuridad.

Después de 12 meses en las mismas condiciones de cultivo no hubo variación en el número de clones en cultivo aunque se observó un cierto decaimiento respecto a los 7 meses, que no impidió el crecimiento posterior de los brotes.

Como en los tratamientos anteriores, presentaremos los resultados de multiplicación y elongación de los brotes por géneros. En el caso del género *Prunus* lo haremos por especies debido al elevado número de clones.

4.4.1. Género *Prunus*.

- *Prunus cerasifera* (10 clones).

Entre los 10 clones de esta especie, observamos que Mirobolán B (Figura 49) presenta una tasa de multiplicación inferior a 5 y no hay elongación de los brotes en estas condiciones (Tabla 16). El resto, que supone el 90,9% multiplican por encima de 5 brotes por brote. Además, destacan por su elevada tasa de multiplicación (>7 brotes por brote) los clones de Mirobolán 29C, Mirobolán 748 (Figura 49), Mirobolán 469, Mirobolán 605 y Mirobolán P, que suponen el 45,5% del material. En el caso de Mirobolán 29C, Mirobolán P2980, Mirobolán B y Mirobolán P no presentan elongación de los brotes. En los demás clones hay elongación de brotes, lo que supone un 63,6% de los cultivos de esta especie.

Tabla 16: *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Mirobolán 29C	XXX	-
Mirobolán 748	XXX	+
Mirobolán 469	XXX	+
Mirobolán 543	XX	+
Mirobolán 605	XXX	+
Mirobolán 743	XX	+
Mirobolán P2175	XX	+
Mirobolán P2980	XX	-
Mirobolán B	X	-
Mirobolán P	XXX	-
Adara	XX	+



Figura 49: Mirobolán B (izquierda) sin elongación de sus brotes y Mirobolán 748 (derecha) con elongación de los brotes de *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 4.

En la Figura 50 podemos observar las diferencias en la tasa de multiplicación entre los distintos clones. La máxima es de 13,2 para el clon Mirobolán 748, y la más baja de 3,8 para el clon Mirobolán B. En todos los casos la tasa de multiplicación supera los 5 brotes por brote, excepto para este clon.

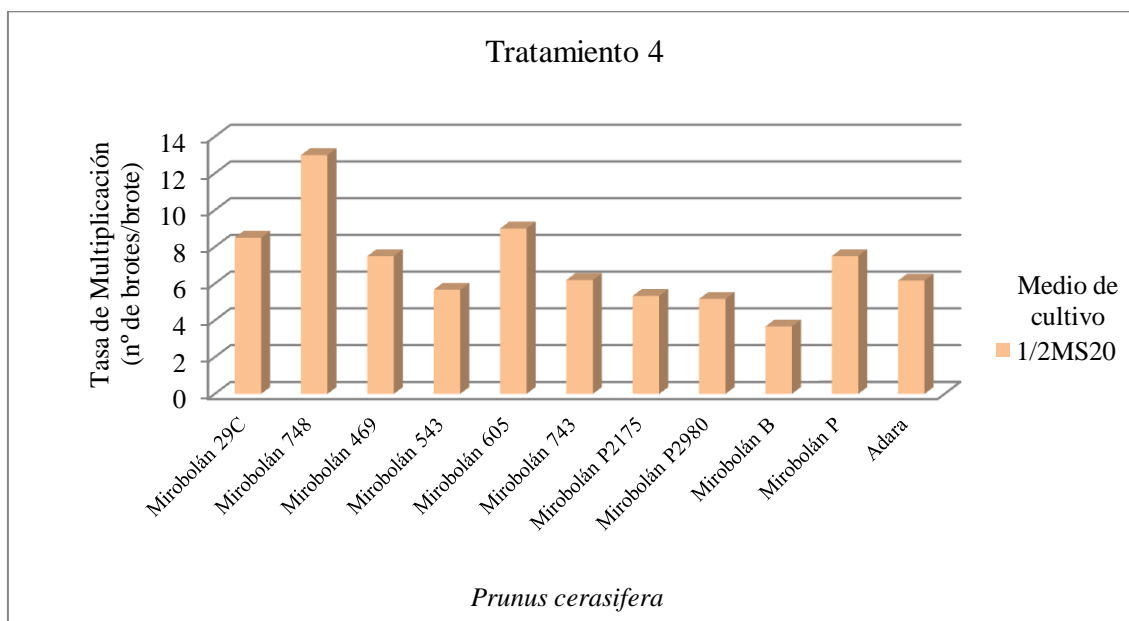


Figura 50: Tasa de multiplicación de *Prunus cerasifera* en el Tratamiento 4.

- *Prunus cerasifera x munsoniana* (4 clones).

Tres de los clones estudiados presentaron alta tasa de multiplicación, y uno muy baja (Tabla 17). El clon Mariana 2624-11 (Figura 51) multiplica poco, menos de 5 brotes por brote y no hay elongación de los brotes; en el resto de los clones del material multiplica por encima de 5. Mariana 2624-12 y Mariana GF 81 multiplican y elongan, y Mariana P multiplica por encima de 7 brotes por brote pero no hay elongación de los brotes.



Figura 51: Mariana 2614-11 perteneciente a *Prunus cerasifera x munsoniana* sin elongación de sus brotes y multiplicación inferior a 5 brotes por brote tras el Tratamiento 4.

Tabla 17: *Prunus cerasifera x munsoniana* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Mariana 2624-11	X	-
Mariana 2624-12	XXX	+
Mariana GF 81	XXX	+
Mariana P	XXX	-

El clon Mariana 2624-11 en este tratamiento destaca por la baja tasa de multiplicación (3,6). El resto de los clones superan el 8 de tasa de multiplicación, siendo la máxima tasa para Mariana 2624-12 con 9,4 brotes por brote (Figura 52).

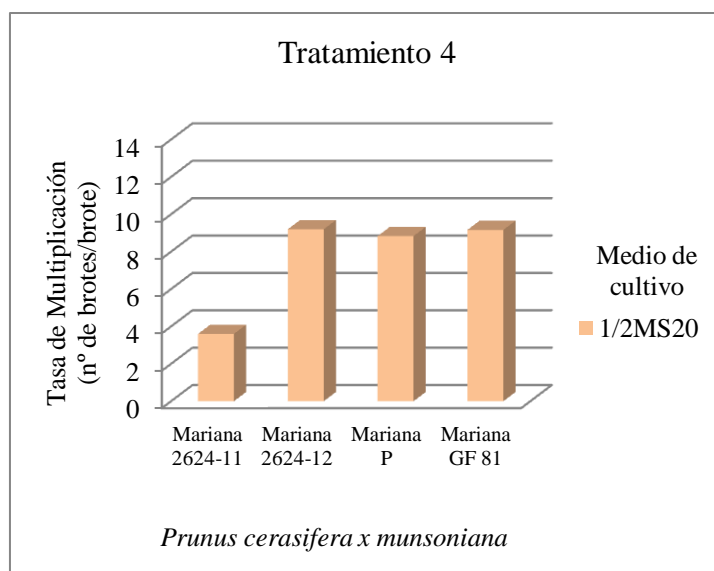


Figura 52: Tasa de multiplicación de *Prunus cerasifera x munsoniana* en Tratamiento 4.

- *Prunus cerasifera x armeniaca* (77 clones).

Este tratamiento es la continuación en el tiempo del Tratamiento 3, observando las variables elongación y tasa multiplicación a los 12 meses. Los resultados observados no han experimentados cambios respecto al Tratamiento 3, por lo que valen las mismas conclusiones, existiendo una fuerte asociación entre las variables, de forma que los brotes que tienen una tasa de multiplicación mayor que 5 presentan elongación, mientras que cuando la tasa de multiplicación es menor que 5 no la presentan.

Podemos observar el estado del material con alta o baja tasa de multiplicación en el medio de cultivo 1/2MS20 y la elongación o no de sus brotes en cultivo en la Figura 53.



Figura 53: Clon 74 (izquierda) con brotes elongados y alta tasa de multiplicación y clon 72 (derecha) con brotes no elongados y baja tasa de multiplicación, ambos clones pertenecientes a *Prunus cerasifera x armeniaca* al salir del Tratamiento 4.

- *Prunus domestica* (15 clones).

De los clones de ciruelo estudiados, 12 multiplican bien y hay elongación de sus brotes, a excepción de 1 que multiplica bien pero no elonga (Tabla 18). Esto supone que el 80% del material de este grupo multiplica por encima de 5 brotes por brote. Entre los clones que multiplican poco, con tasa menor de 5, el Ciruelo 9 y 11 presentan mal aspecto al finalizar el experimento. La tasa de multiplicación es muy baja en estos clones y no hay elongación de los brotes. Supone el 13,3% de los clones.

El clon Reina Claudia Verde (Ciruelo-1) presenta sin embargo una alta tasa de multiplicación de 11 brotes por brote y los brotes elongan (Figura 54).

Figura 54: Reina Claudia Verde (ciruelo-1) con elongación de los brotes y tasa de multiplicación 11 brotes por brote.



Tabla 18: *Prunus domestica* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Ciruelo-1	XXX	+
Ciruelo-2	XX	-
Ciruelo-3	XX	+
Ciruelo-4	XX	+
Ciruelo-5	XX	+
Ciruelo-6	XX	-
Ciruelo-7	XX	+
Ciruelo-8	X	-
Ciruelo-9	X MAL	-
Ciruelo-10	XX	-
Ciruelo-11	X MAL	-
Ciruelo-12	XX	+
Ciruelo-13	XXX	+
Ciruelo-14	XX	+
Ciruelo-15	XXX	+

- *Prunus insititia* (1 clon).

Durante todo el periodo de 12 meses de crecimiento lento en oscuridad y en el medio 1/2MS20, el clon Pollizo 25 responde bien, multiplica mucho y elongan los brotes (Figura 55). Su tasa de multiplicación está por encima de 7, llegando a una media de 8,2 brotes por brote lo cual es una elevada proporción en cultivo lento.



Figura 55: Pollizo 25 de la especie *Prunus insititia* con elongación de los brotes y tasa de multiplicación 8,2 brotes por brote al finalizar el Tratamiento 4.

- Cerezos: *Prunus cerasus* (2 clones) y *Prunus avium* x *pseudocerasus* (1 clon).

En el grupo de los cerezo observamos que en estas condiciones tras el periodo de 12 meses, todos los clones multiplican y sus brotes elongan, sin excepción (Tabla 19).

Tabla 19: *Prunus cerasus* y *Prunus avium* x *P.pseudocerasus* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Cab 6P	XXX	+
Cab P	XX	+
Colt	XXX	+

La tasa de multiplicación menor corresponde a Cab P (Figura 56) y sin embargo es superior a 6 brotes por brote en todos los clones (Figura 57), lo que es un buen promedio, y en el clon Cab es de más de 8 brotes por brote. Todos los cerezos estudiados se comportan de una manera similar en estas condiciones.



Figura 56: Cab P perteneciente a *Prunus cerasus* con elongación de sus brotes y alta tasa de multiplicación (>7 brotes por brote) en el Tratamiento 4.

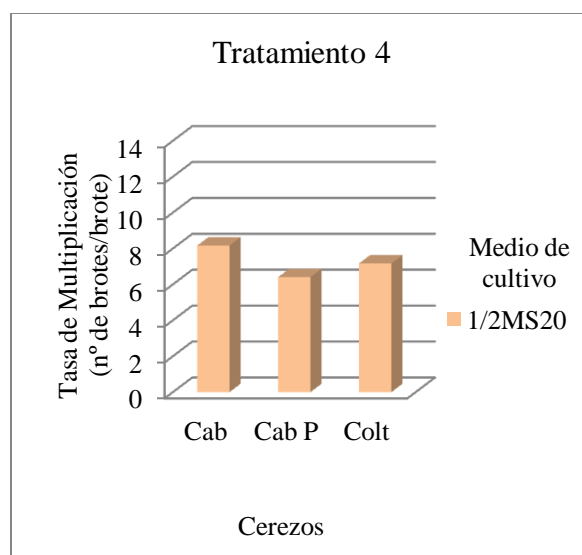


Figura 57: Tasa de multiplicación de *Prunus cerasus* y *Prunus avium* x *pseudocerasus* en el Tratamiento 4.

- Melocotonero e híbridos: *Prunus persica* (1 clon), *Prunus amygdalus x persica* (6 clones) y *Prunus persica x davidiana* (2 clones).

En este grupo no sobreviven todos los clones. Cadaman, probablemente por sus necesidades de cultivo a mayor temperatura, muere a los 4 meses de cultivo a 4°C.

Los resultados de multiplicación y elongación muestran que sólo 3 clones de los 8 supervivientes multiplican con 5 brotes por brote o más (Tabla 20), son los clones de Adarcias 0, Adafuel 0 y GxN 22, suponen el 37,5% del material. Sin embargo en la mayoría de los clones no hay elongación de sus brotes con estas condiciones (75%), a excepción de Adarcias 7 y GF677.

El melocotonero GF305 tiene la tasa más baja de multiplicación, sólo 1,1 brotes por brote (Figura 58). Una gran diferencia con el clon de mayor tasa, el híbrido GxN 22 con 7,5 brotes por brote como media. Los resultados presentan una alta variabilidad, donde el 62,5% de los clones no llega a una tasa de multiplicación de 5 (Figura 59).

Tabla 20: *Prunus persica*, *Prunus amygdalus x persica* y *Prunus persica. x davidiana* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
GF305	X	-
Adarcias 0	XX	-
Adarcias 7	X	+
Adafuel	X	-
Adafuel 0	XX	-
GF 677	X	+
GxN 22	XXX	-
Nemaguard	X	-
Cadaman	----	----



Figura 58: GF 305 perteneciente a *Prunus persica* sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación de 1,1 brotes por brote en el Tratamiento 4.

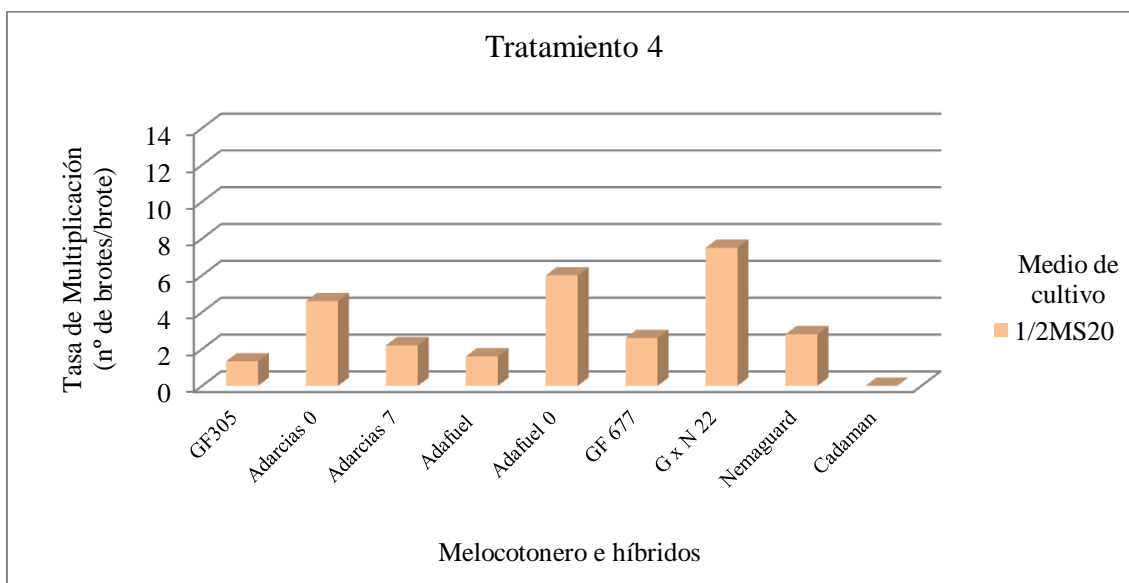


Figura 59: Tasa de multiplicación de *Prunus persica*, *Prunus amygdalus x persica* y *Prunus persica x davidiana* en el Tratamiento 4.

- *Prunus spinosa* (6 clones).

Entre los clones de *Prunus spinosa* únicamente 2 clones multiplican por encima de 7 brotes por brote, también elongan y suponen el 33,3% del material. El resto de los

clones en cultivo multiplican poco (<5 brotes por brote) y no elongan (Tabla 21). Después de 12 meses en crecimiento lento, los clones que multiplican poco y no presentan elongación de los brotes tienen mal aspecto y comienza el empardecimiento de los brotes (Figura 60).



Figura 60: Clon endrino 1 perteneciente a *Prunus spinosa* sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación inferior a 5 brotes por brote en el Tratamiento 4.

Tabla 21: *Prunus spinosa* en el Tratamiento 4. Resultados de multiplicación en crecimiento lento (X para <5 brotes por brote, XX con tasa entre 5-7 brotes por brote, o XXX si son >7 brotes por brote). Elongación (+) o no elongación (-).

1/2MS20	Multiplicación	Elongación
Endrino 1	X MAL	-
Endrino 2	X MAL	-
Endrino 3	X MAL	-
Endrino 4	XXX	+
Endrino 5	XXX	+
Endrino 6	X MAL	-

El 66,7% de los clones presentan una tasa de multiplicación entre 3,2 y 3,5. Sólo dos clones: 4 y 5, multiplican con una tasa alta de 10 y 12 brotes por brote respectivamente (Figura 61).

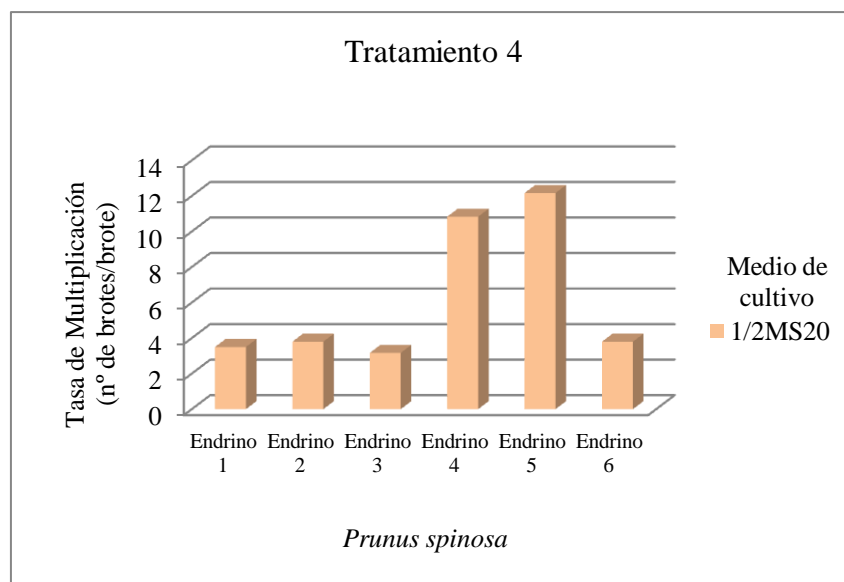


Figura 61: Tasa de multiplicación de *Prunus spinosa* en el Tratamiento 4.

4.4.2. Género *Malus*: *Malus domestica* (2 clones).

De los dos clones de manzano estudiados, Douce D´Jerba multiplica un poco más que Jork 9, y en ambos clones hay elongación de los brotes. La tasa de multiplicación está entre 4 para Jork 9 y 5 para Douce D´Jerba, sin embargo los brotes presentan mal aspecto en ambos clones, con empardecimiento en la base y aspecto vítreo en la parte aérea (Figura 62).



Figura 62: Manzano Douce D'Jerba (género *Malus*) con elongación de los brotes tras el Tratamiento 4.

4.4.3. Género *Pyrus*: *Pyrus communis* (1 clon).

El clon de peral estudiado multiplica poco (<5 brotes por brote) y presenta elongación de los brotes.

La tasa de multiplicación es de 3,3 brotes, sin embargo, el material comienza a ponerse pardo por la parte del ápice en algunos de los brotes elongados (Figura 63).



Figura 63: Peral perteneciente al género *Pyrus* con algún brote muerto tras el Tratamiento 4.

4.4.4. Género *Ficus*: *Ficus carica* (2 clones).

Los resultados observados en ambos clones indican que las higueras multiplican poco (menos de 5 brotes por brote) y no presentan elongación (Figura 64).



Figura 64: Higuera S4 perteneciente al género *Ficus* con tasa de multiplicación menor de 5 brotes por brote y sin elongación de los brotes en el Tratamiento 4.

La tasa de multiplicación es de 1,2 para el clon de higuera S4 y de 1,4 para el clon Napolitana. Es una tasa muy baja teniendo en cuenta que en condiciones de crecimiento activo presentan una multiplicación muy elevada.

4.4.5. Género *Punica*: *Punica granatum* (1 clon).

El clon de granado murió antes de finalizar el tiempo del ensayo.

4.4.6. Género *Cydonia*: *Cydonia oblonga* (2 clones).

Los dos clones de membrillero presentan una baja tasa de multiplicación y los brotes elongan. Los brotes de estos clones, al pasar los 12 meses comienzan a tener un aspecto pardo (Figura 65). Membrillero EM-C tiene una tasa de multiplicación de 3,6 más del doble que Membrillero BA 29 con tasa de multiplicación 1,6.



Figura 65: Membrillero EM-C perteneciente al género *Cydonia* con elongación de los brotes en el Tratamiento 4.

4.4.7. Género *Eriobotrya*: *Eriobotrya japonica* (2 clones).

Observamos que en los dos clones de este género no existe elongación de los brotes y multiplican muy poco (por debajo de 5 brotes por brote). Para el clon níspero japonés-1 la tasa es de 0.8, no llega ni a 1 brote por brote, y para el clon níspero japonés-2 es de 1,75 brotes por brote. Sobrevive la mayor parte del material, pero alguno de los brotes de estos clones muere durante los meses de crecimiento lento (Figura 66).



Figura 66: Níspero japonés 1 perteneciente al género *Eriobotrya* sin elongación de los brotes y con tasa de multiplicación 1,75 brotes por brote en el Tratamiento 4.

4.4.8. Género *Crataegus*: *Crataegus monogyna* (3 clones).

Todos los clones del género en estas condiciones reaccionan de igual forma: sus brotes multiplican mucho (>7 brotes por brote) y existe elongación de los brotes superando el tamaño del frasco de cultivo que los contiene (Figura 67).

La tasa de multiplicación es elevada, 12 para el clon 1 y la máxima de 14 para el clon 2 (Figura 68).



Figura 67: Espino Albar 2 del género *Crataegus* con elongación de sus brotes y tasa de multiplicación 14 brotes por brote en el Tratamiento 4.

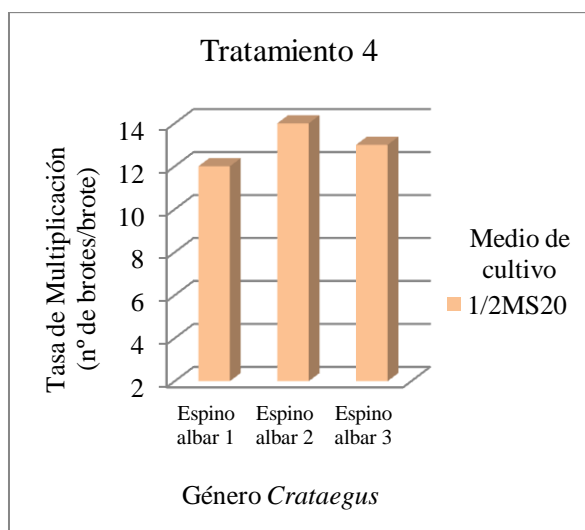


Figura 68: Tasa de multiplicación de los clones del género *Crataegus* en Tratamiento 4.

4.5. EFECTO LUZ/OSCURIDAD

El mantenimiento de estas especies frutales en condiciones de crecimiento ralentizado con iluminación continua provocó el decaimiento rápido de todos los cultivos indicando que la presencia de luz continua es desfavorable para la conservación de este material.

El control del estado de las plantas durante el Tratamiento 1 con luz continua se realizó inicialmente cada 4 semanas, pero el resto de revisiones se hicieron cada 15 días debido al mal estado del material. A los 2 meses y medio se suspende el ensayo de luz continua debido al mal aspecto de los cultivos, con defoliación masiva y peligro de perder el material, quedando eliminada la luz continua para los siguientes tratamientos.

El porcentaje de supervivencia de los clones (% de clones vivos a 4°C respecto al número inicial de clones) en los tratamientos en oscuridad (Tratamientos 2, 3, y 4) superó el 97% (Figura 69), por lo que se observa que para el cultivo de estas especies en crecimiento lento han de mantenerse en oscuridad.

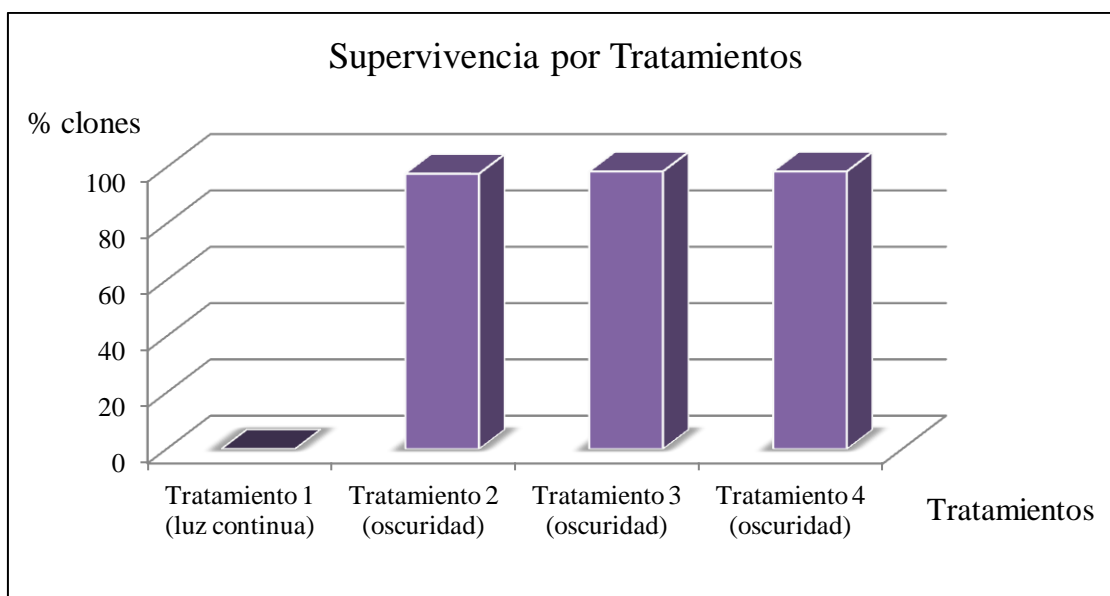


Figura 69: Gráfico del porcentaje de supervivencia de los clones según los diferentes tratamientos.

4.6. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO

Se han comparado dos medios de cultivo diferentes, en similares condiciones de crecimiento, basados en el medio de cultivo MS: MS20 y 1/2 MS20 que difieren en la cantidad de macronutrientes.

El porcentaje de supervivencia de los clones después de las distintas condiciones de crecimiento ralentizado, ha sido similar. Comparando los medios MS20 (Tratamiento 2) donde la supervivencia es del 97,8% de los clones, y 1/2MS20 (Tratamientos 3 y 4) con una supervivencia del 98,6% de los clones, la diferencia es inapreciable (Figura 70).

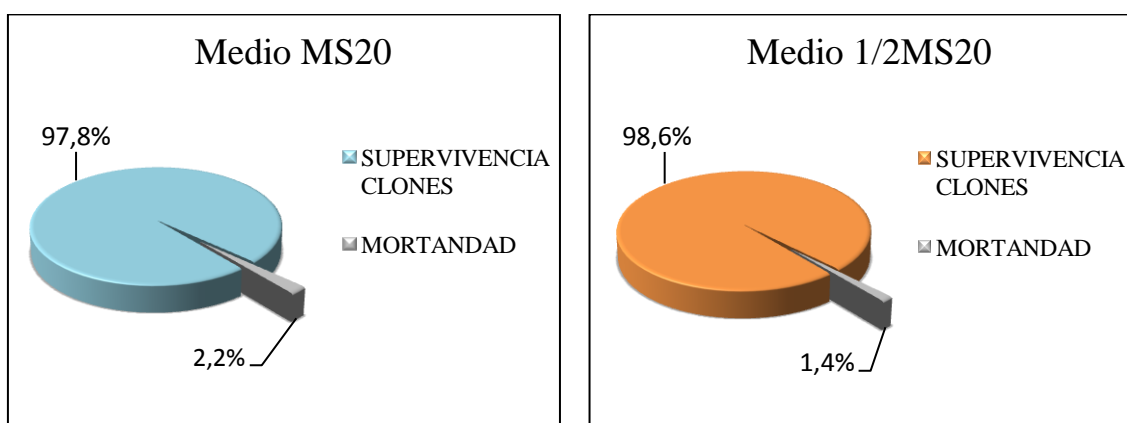


Figura 70: Gráfico del porcentaje de supervivencia en los medios de cultivo MS20 y 1/2MS20

En los géneros *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia*, *Eriobotrya* y *Crataegus*, la supervivencia es del 100% en todos los tratamientos (Figura 71). El género *Punica* no ha sobrevivido con los tratamientos utilizados en crecimiento ralentizado en este trabajo. En el género *Ficus* se obtiene el 100% de supervivencia para el medio de cultivo 1/2MS20, y sólo el 50% en MS20 al morir todos los brotes de uno de los clones del estudio. El género *Prunus* presenta un 99,2% de supervivencia en todos los tratamientos.

Este porcentaje de supervivencia global del 98,6% es un resultado muy satisfactorio.

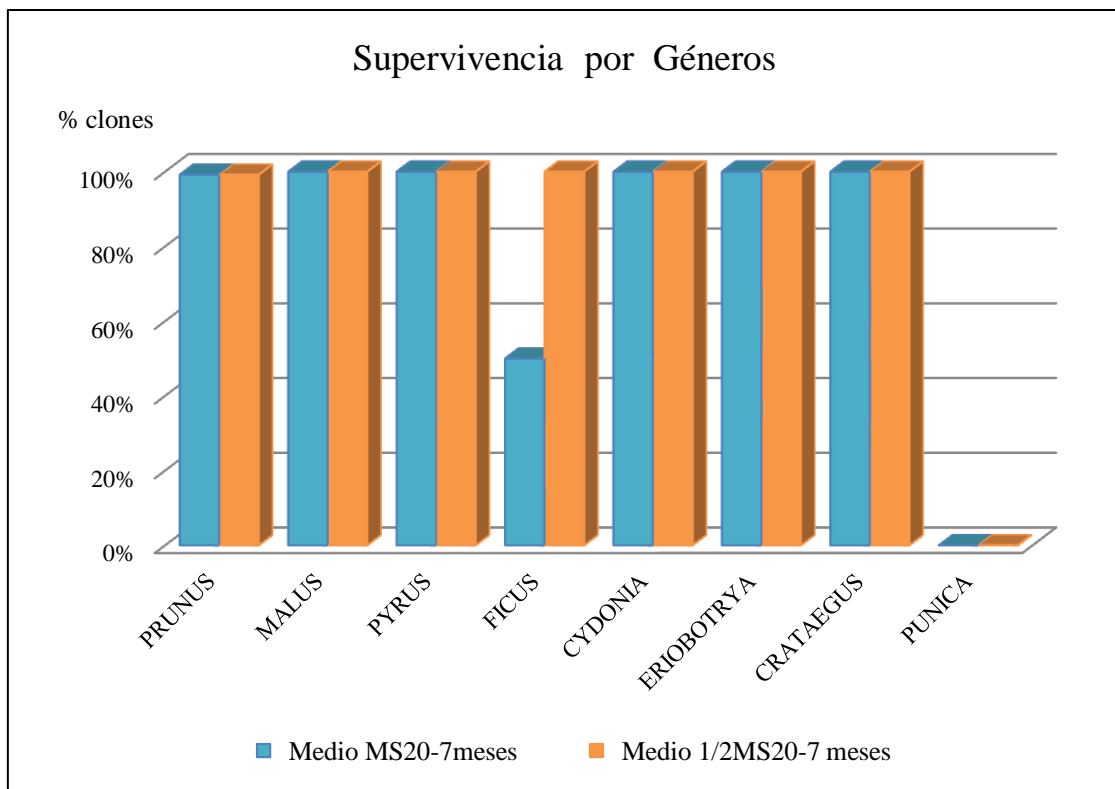


Figura 71: Comparación del porcentaje de supervivencia de los clones en los Tratamientos 2 y 3 según los diferentes géneros.

El porcentaje de supervivencia en los 2 medios de cultivo para los 138 clones estudiados ha superado el 97% tras un periodo de 7 meses de cultivo en frío (Figura 70). Sin embargo, si analizamos los resultados obtenidos en ambos medios de cultivo con respecto a la tasa de multiplicación, para los diferentes géneros (excepto *Prunus*), se observa que el medio 1/2MS20 mejora la tasa de multiplicación en los clones de todos los géneros excepto para Higuera S4, en el que la tasa de multiplicación en el medio MS20 es más del doble que la obtenida en el medio 1/2MS20 (Figuras 72 y 73). En el género *Punica* no obtenemos respuesta en ninguno de los 2 medios, muriendo a lo largo de los tratamientos.

En el género *Crataegus* se observa la mayor diferencia de comportamiento entre los dos medios de cultivo, indicando la importancia de utilizar un medio de cultivo adecuado para la conservación de cada material (Figura 74). En este género la tasa de multiplicación en MS20 se sitúa entre 1,1 y 1,4 mientras que para el medio de cultivo 1/2MS20 se sitúa entre 12 y 14 brotes por brote, lo que supone un aumento del 92% en la tasa entre ambos medios.

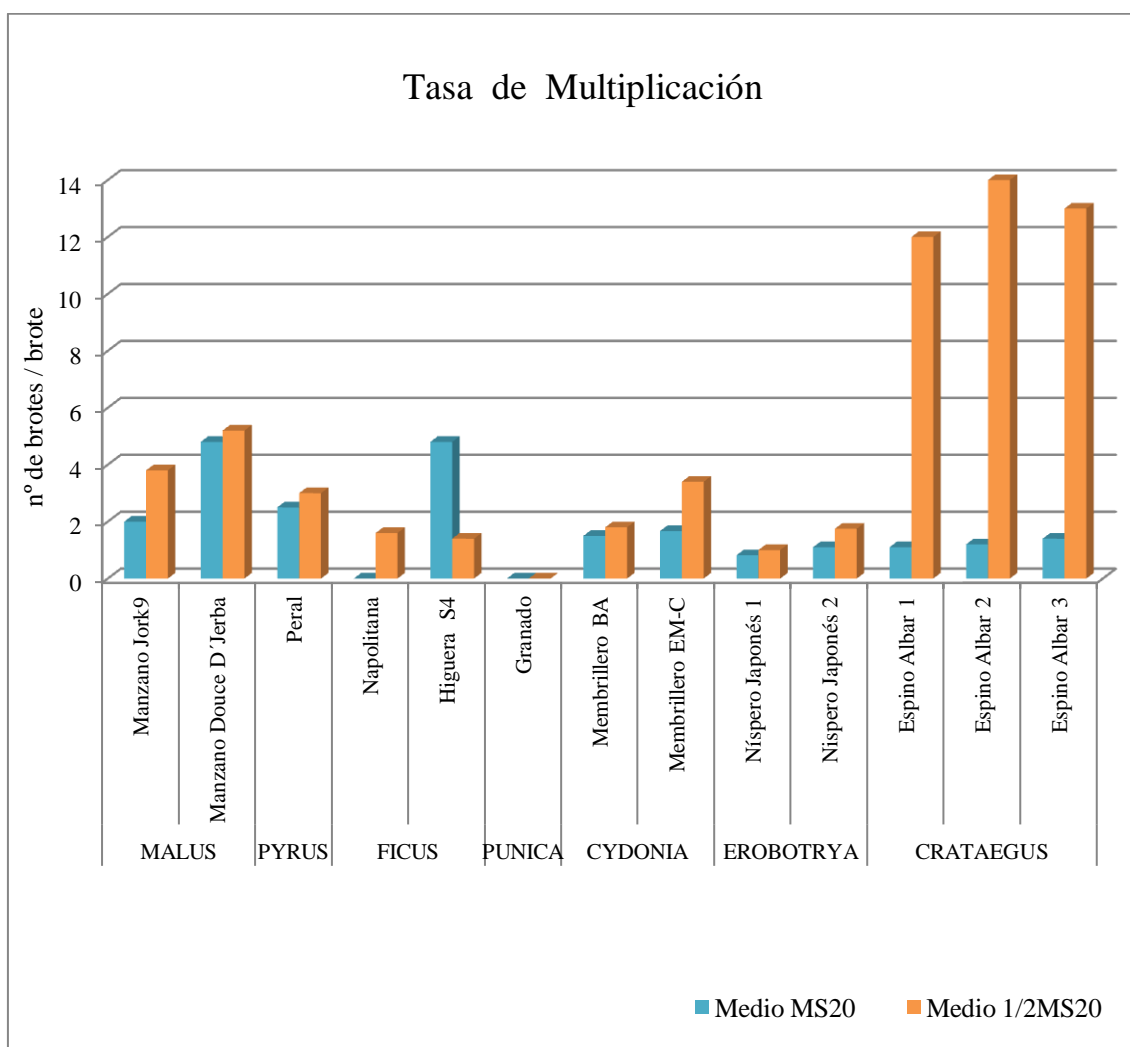


Figura 72: Comparación de la tasa de multiplicación de 7 géneros en los medios de cultivo MS20 y 1/2MS20.



Figura 73: Clon Higuera S4 perteneciente al género *Ficus* al salir del crecimiento lento de 7 meses, a la izquierda en el medio MS20 y a la derecha en el medio 1/2MS20.

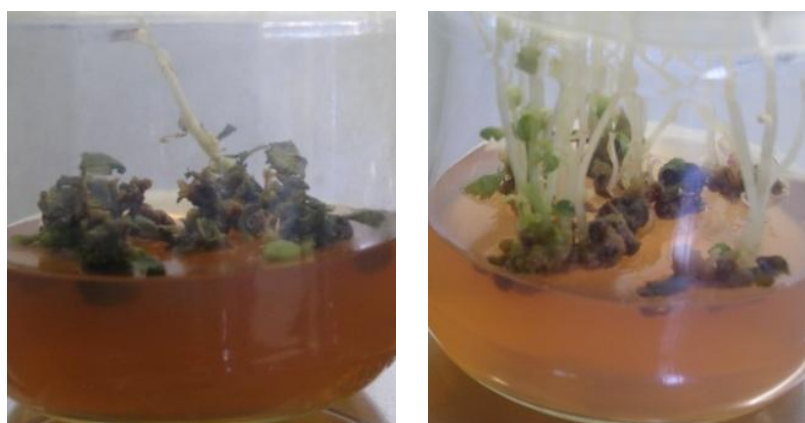


Figura 74: Clon Espino Albar 2 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) del género *Crataegus* al salir del crecimiento lento de 7 meses.

Hay que destacar también que entre estos géneros únicamente el género *Crataegus* en sus tres clones y en el género *Malus* el manzano Douce D'Jerba cultivados en el medio de cultivo 1/2MS20 (Figura 75), y la Higuera S4 del género *Ficus* en el medio MS20 alcanzan una tasa de multiplicación de 5. En el resto del material estudiado, la tasa de multiplicación fue siempre inferior a 5 en cualquiera de los dos medios de cultivo.



Figura 75: Clon Manzano Douce D'Jerba, perteneciente al género *Malus*, en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) al salir del crecimiento lento de 7 meses.

En cuanto a la elongación de los brotes, no hay diferencias apreciables entre los dos medios de cultivo, ya que si un clon elonga lo hace en los dos medios y en el caso contrario, en ninguno. El género *Eriobotrya* es la excepción ya que sus clones presentan elongación de brotes en el medio de cultivo MS20 y no elongan en el medio de cultivo 1/2MS20 (Figura 76).



Figura 76: Clon Níspero 1 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) del género *Eriobotrya* tras el crecimiento lento durante 7 meses.

Los resultados obtenidos para los 125 clones del género *Prunus* mostraron que la supervivencia en cualquiera de los tratamientos superó el 99% de los clones (Figura 70). Únicamente el clon Cadaman, híbrido de *Prunus persica. x davidiana*, muere antes de los 7 meses en cualquiera de los dos medios.

Sin tener en cuenta los 77 híbridos de ciruelo por albaricoquero, la tasa de multiplicación de los otros 35 clones de *Prunus*, muestran diferencias entre los dos medios de cultivo utilizados (Figura 81). Así, la tasa es mayor en el medio 1/2MS20 en la especie *P. cerasifera* para cuatro clones de diez: Mirobolán 748, Mirobolán 743, Mirobolán B, Mirobolán P y Adara (Figura 77) en el mismo periodo de tiempo.

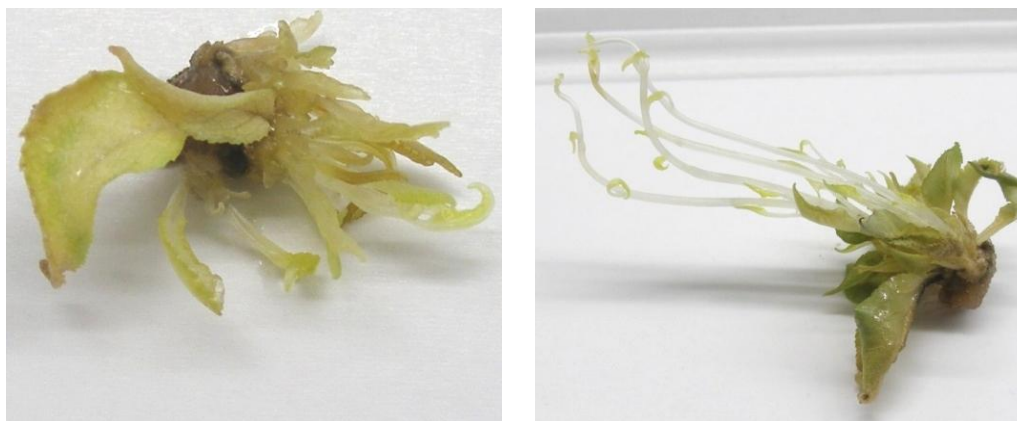


Figura 77: Clon Adara en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de *Prunus cerasifera* al salir crecimiento lento durante 7 meses.

Mayores tasas de multiplicación en medio 1/2MS20 las encontramos también en Mariana P y cuatro clones de híbrido almendro x melocotonero (Adarcias 0, GxN 22, GF 677 y Nemaguard) así como en un clon de *P. spinosa* (Endrino 4). Por otra parte, la tasa de multiplicación en el medio MS20 fue superior en otros clones: Mirobolán P2980, Mariana 2624-11, y Adafuel, así como en tres de los seis clones de *P. spinosa*.

El 31,4% de los clones del género *Prunus* multiplica más en el medio de cultivo 1/2MS20 frente al 20% que lo hace en el medio de cultivo MS20 (Figura 78). Para el resto de los clones de éste género (48,6%) su respuesta de multiplicación es similar en ambos medios de cultivo (Figura 79).



Figura 78: Clon de Mariana 2621-11 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de *P. cerasifera x munsoniana* tras el crecimiento lento durante 7 meses.

Cabe señalar que los clones Mirobolán B, GF 305, Adarcias 7, Adafuel, GF677 y Nemaguard, tienen una tasa de multiplicación inferior a 5 en ambos medios de cultivo (MS20 o 1/2MS20) (Figura 79).

En cuanto a la elongación de los brotes, 13 de los 35 clones de *Prunus* anteriormente indicados varían según el medio en el que estén. Mirobolán 743 (Figura 80), Adara y Mariana P presentan elongación de los brotes sólo en el medio de cultivo 1/2MS20, y sin embargo en los clones Mirobolán P2980, Mariana 2624-11, Mariana GF81 (Figuras 81), Adafuel, Adafuel 0, GxN 22 y Nemaguard (Figura 82) presentan elongación de los brotes únicamente en el medio de cultivo MS20. El endrino 4 (*P. spinosa*) presenta elongación de los brotes en el medio de cultivo 1/2MS20, y sin embargo en los clones Endrino 2 y Endrino 3 hay elongación de los brotes únicamente en el medio de cultivo MS20.

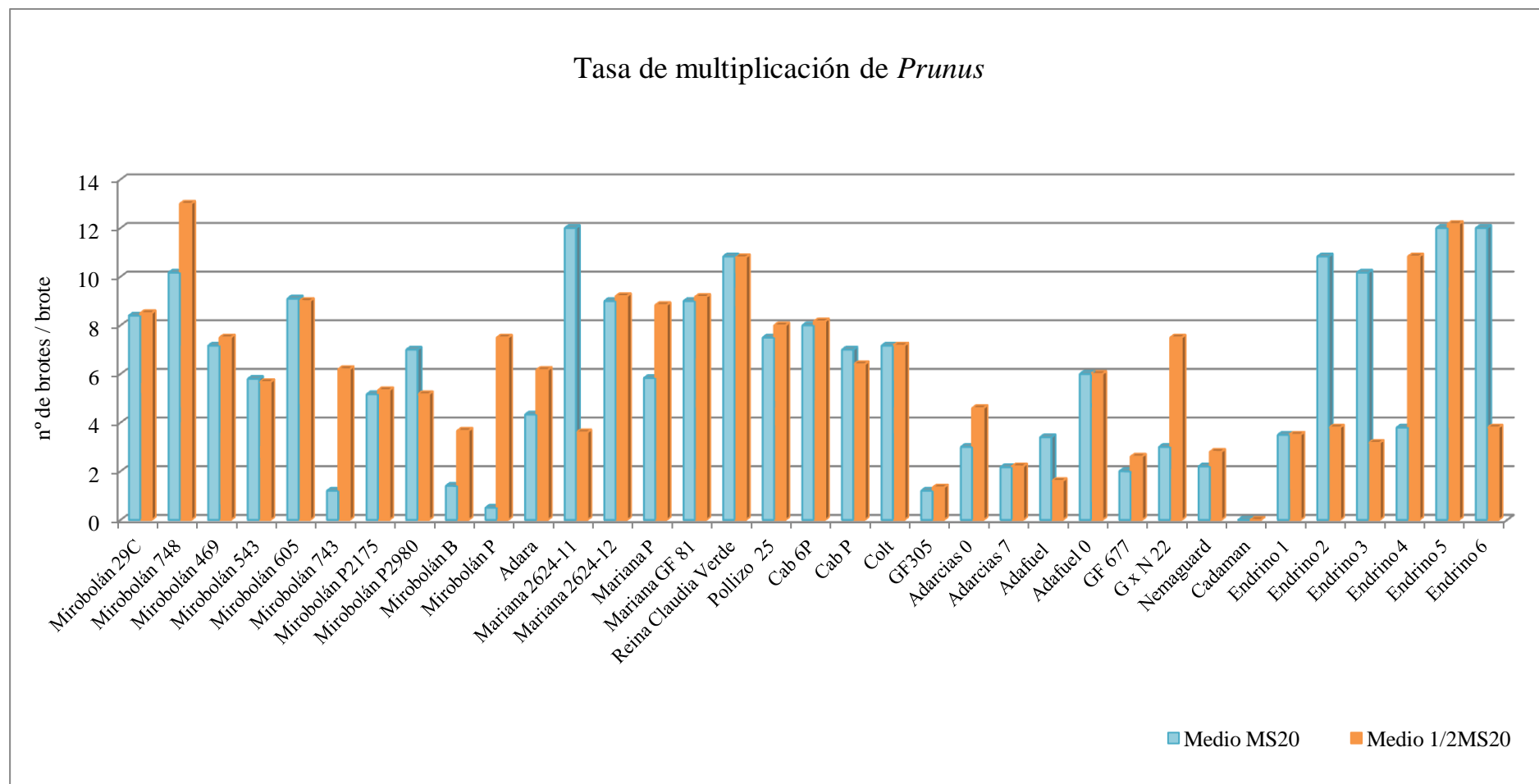


Figura 79: Comparación de la tasa de multiplicación de los clones del género *Prunus* en los medios de cultivo MS20 y 1/2MS20.



Figura 80: Mirobolán 743 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de la especie *Prunus cerasifera* en crecimiento lento durante 7 meses.



Figura 81: Marian GF-81 en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de la especie *Prunus cerasifera x munsoniana* en crecimiento lento durante 7 meses.



Figura 82: Nemaguard en el medio MS20 (izquierda) y en el medio 1/2MS20 (derecha) de la especie *Prunus amygdalus x persica* en crecimiento lento durante 7 meses.

Por otra parte el efecto de los medios de cultivo en el comportamiento del grupo de híbridos *P. cerasifera x armeniaca* (77 clones) muestra grandes diferencias en el hábito de crecimiento de los brotes, ya que las variables ‘tasa de multiplicación’ y ‘elongación’ de los brotes muestran en el estudio estadístico diferente grado de asociación según el medio de cultivo utilizado. Cuando los brotes crecen en MS20 no hay grado de asociación estadísticamente significativo (Figura 83, Tabla 4), mientras que en 1/2MS20 las variables muestran una fuerte asociación (Figura 84, Tabla 11). La representación gráfica de las frecuencias relativas, respecto a la tasa de multiplicación ayuda a ver estas diferencias (Figura 83 Y 84).

En el medio de cultivo 1/2MS20 observamos la tendencia de que cuando los brotes multiplican menos de 5 brotes por brote no muestran elongación, mientras que con tasas de multiplicación superiores a 5 los brotes muestran elongación. Por otra parte, en el medio MS20 se observa esta tendencia sólo cuando la tasa de multiplicación es inferior a 5, en cuyos brotes no hay elongación, pero no se mantiene la tendencia cuando la tasa de multiplicación es superior a 5 (Figuras 83 y 84).

Mientras en el medio de cultivo MS20 las diferencias encontradas pueden deberse al azar al no ser estadísticamente significativas, en el medio 1/2MS20 no, ya que la probabilidad de que la asociación entre elongación y multiplicación sea debida al azar es extremadamente pequeña.

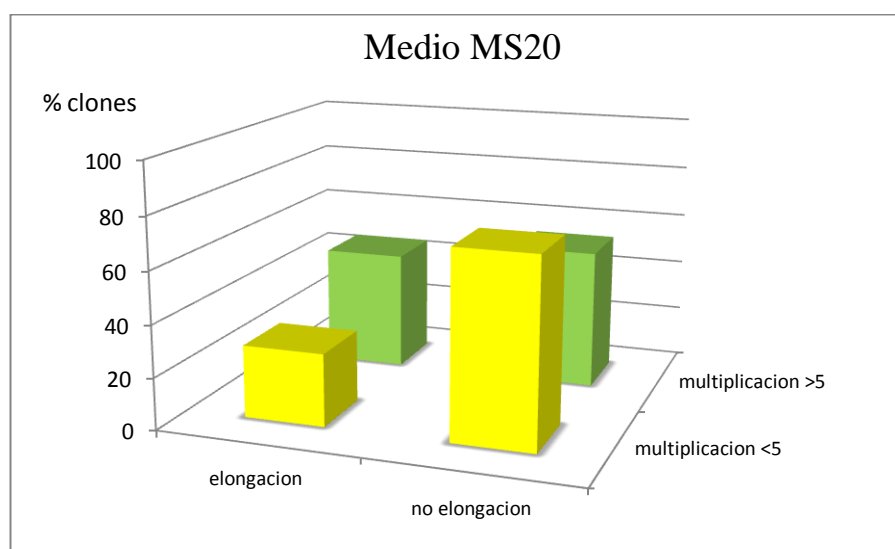


Figura 83: Frecuencias relativas en el medio MS20, respecto a la tasa de multiplicación, de los clones de *P. cerasifera x armeniaca* que presentan, o no, elongación.

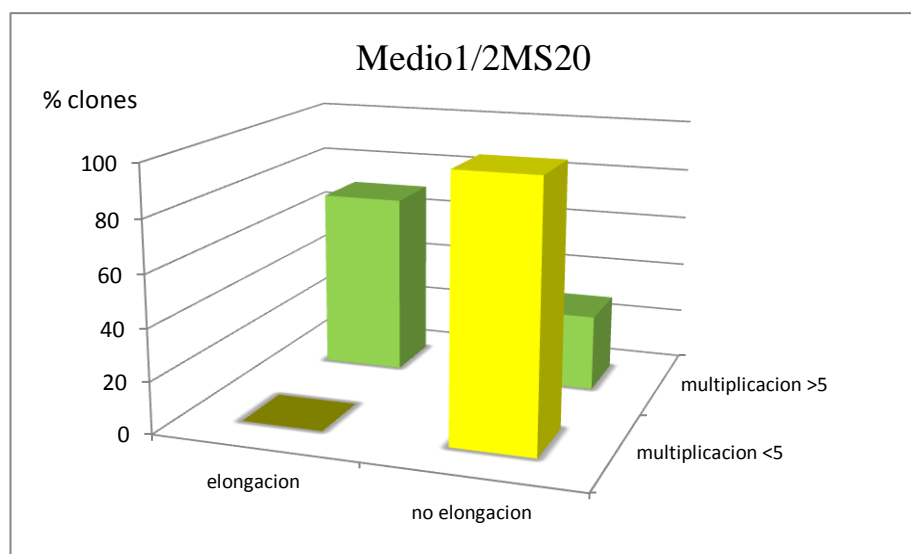


Figura 84: Frecuencias relativas en el medio 1/2MS20, respecto a la tasa de multiplicación de clones de *P. cerasifera x armeniaca* que presentan, o no, elongación.

En el medio MS20 elongan el 31% de los clones que presentan una tasa de multiplicación superior a 5, mientras los que presentan tasa >5 en el medio 1/2MS20 elongan el 56%. Con respecto a la tasa de multiplicación, en el medio MS20 un 67% multiplica más de 5 brotes y sin embargo en 1/2MS20 un mayor porcentaje de clones (79%) multiplica por encima de 5 (Tabla 22). Algunos clones presentan un comportamiento distinto según el medio: multiplican y elongan o no multiplican ni elongan (Figura 85).

Tabla 22: Resultados de multiplicación y elongación de los brotes de *Prunus cerasifera x armeniaca* en los medios utilizados expresado en porcentaje (Tratamiento 2 y 3).

%	Elongación		No elongación	
	MS20	1/2MS20	MS20	1/2MS20
Multiplicación<5	9	0	24	21
Multiplicación>5	31	56	36	23

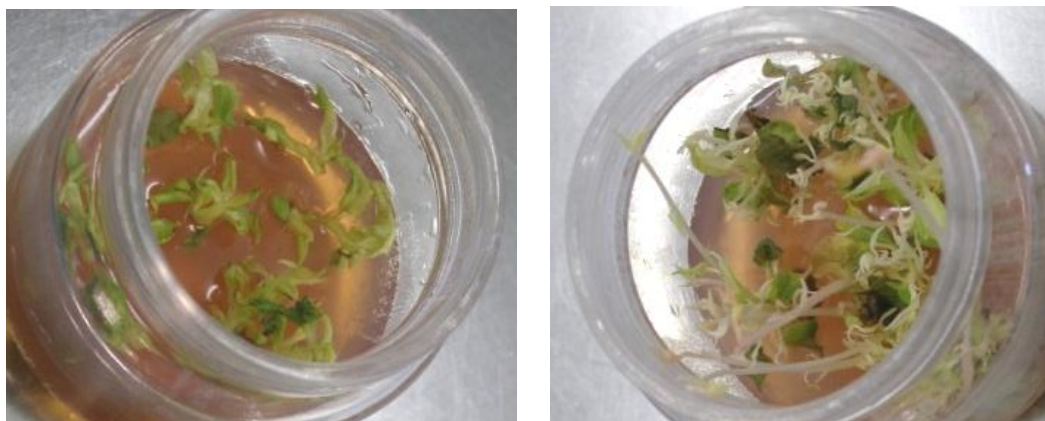


Figura 85: Clon nº 18 (*Prunus cerasifera x armeniaca*) tras 7 meses en crecimiento lento en el medio MS20 (izquierda) con brotes con baja tasa de multiplicación y no elongados, y en el medio 1/2MS20 (derecha) con brotes con alta tasa de multiplicación y elongados.

4.7. EFECTO TIEMPO

El efecto del tiempo en cultivo a bajas temperaturas se ha estudiado analizando los resultados del Tratamiento 3 y Tratamiento 4, que varían únicamente en la duración del tratamiento de 7 o 12 meses respectivamente. El porcentaje de supervivencia para ambos tratamientos, en el estudio global de los 148 clones, es la misma para un periodo de 7 ó 12 meses, superando una supervivencia del 97% de los clones. Únicamente el clon Cadaman del género *Prunus* y el clon de granado del género *Punica* murieron a los 4 meses de permanencia en estas condiciones de cultivo lento en ambos tratamientos.

La elongación de los brotes no depende tampoco del periodo de tiempo de permanencia en el cultivo ralentizado. Los clones que no presenta elongación a los 7 meses de cultivo tampoco la presentan a los 12.

Sin embargo, se observa en algunos casos un empeoramiento del estado de los clones al finalizar el periodo de 12 meses. Los resultados se analizaron para los diferentes géneros observando el empeoramiento e incluso la muerte de algunos brotes del material al permanecer un periodo de 12 meses en estas condiciones.

La tasa de multiplicación en algunos clones mejora si el cultivo permanece durante 12 meses en condiciones de crecimiento ralentizado frente a 7 meses produciéndose un aumento en la tasa del 9% en el mejor de los casos (Espino Albar 1) y del 5% en el peor de los casos (Manzano Jork 9). Para el clon Níspero 2 perteneciente al género *Eriobotrya* no hay variación en su tasa de multiplicación al aumentar el periodo de tiempo en cultivo. Sin embargo, para el clon Douce D'Jerba (género *Malus*), el clon de Peral (género *Pyrus*), los dos clones de *Ficus*, los dos clones de *Cydonia* y el clon Níspero japonés 1 del género *Eriobotrya* disminuye la tasa de multiplicación al morir algunos brotes en el cultivo más prolongado (Figura 86). El género *Crataegus* presenta un incremento de la tasa de multiplicación en todos sus clones (Figura 87).

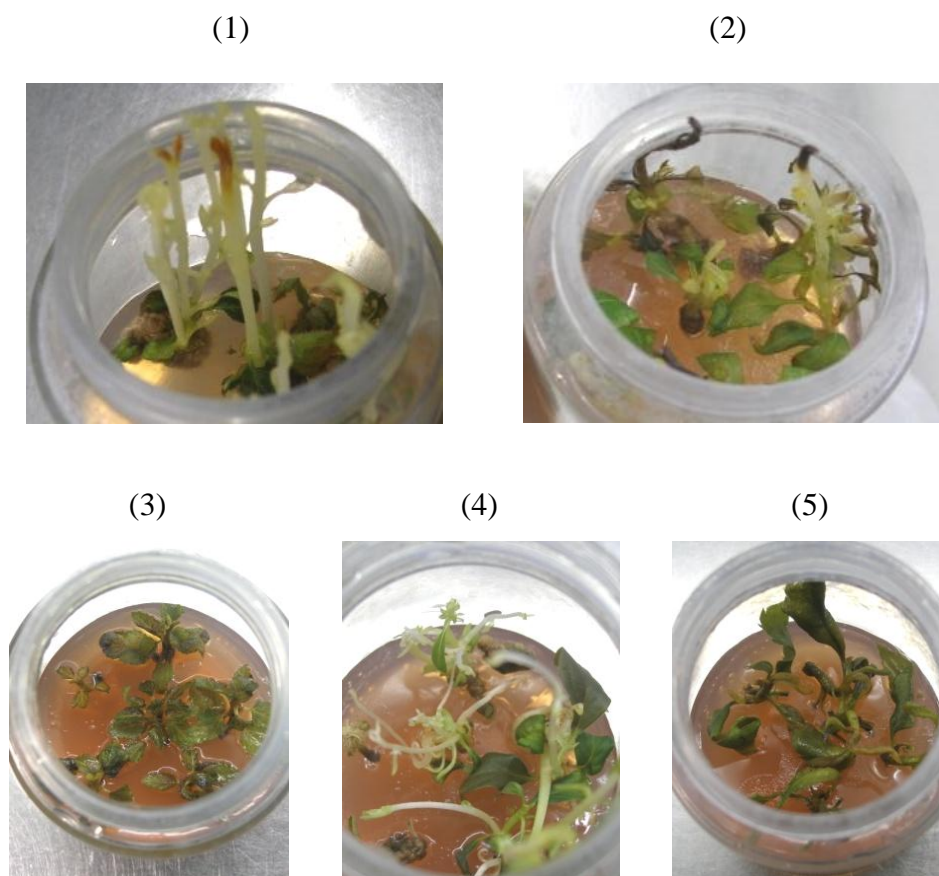


Figura 86: Brotes en cultivo de clones de 5 géneros en 1/2MS20 después de 12 meses en cultivo ralentizado: Manzano Douce D'Jerba (*Malus*) (1). Peral (*Pyrus*) (2). Higuera S4 (*Ficus*) (3). Membrillero BA (*Cydonia*) (4). Níspero japonés-1 (*Eriobotrya*) (5).

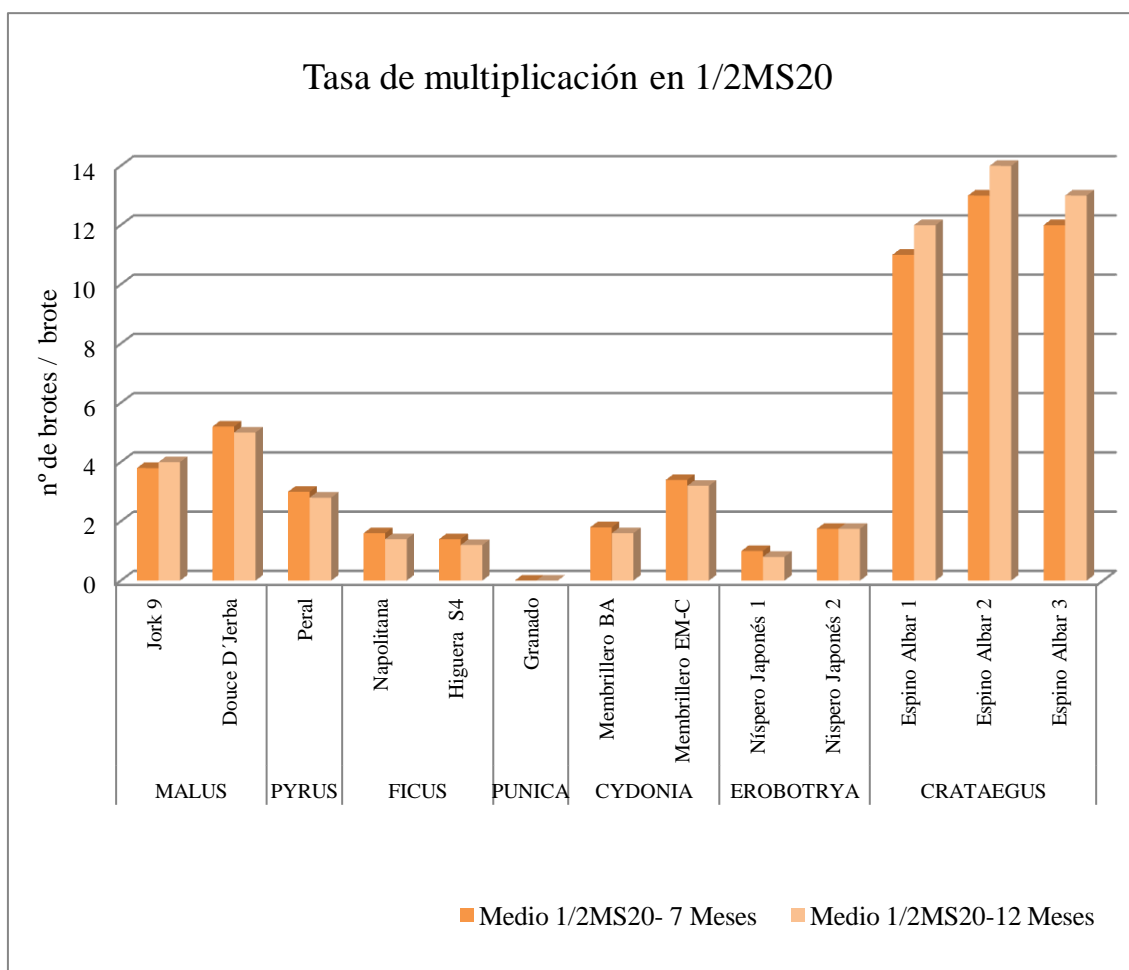


Figura 87: Comparación de la tasa de multiplicación en 7 géneros en el medio de cultivo 1/2MS20 después de 7 y 12 meses en cultivo lento.

En el género *Prunus*, la tasa de multiplicación de los 35 clones estudiados (descontando los 77 híbridos de ciruelo por albaricoquero) presentan diferencias poco importantes entre los dos tiempos de cultivo (Figura 88).

Dentro de la especie *P. cerasifera* la tasa de multiplicación aumenta en la mayoría de los clones cuando los conservamos durante 12 meses, excepto el clon Adara que mantiene la misma tasa, y el clon Mirobolán 29C, que disminuye ligeramente, porque algunos brotes mueren. Sólo 1 de los clones multiplica por debajo de la tasa de multiplicación de 5.

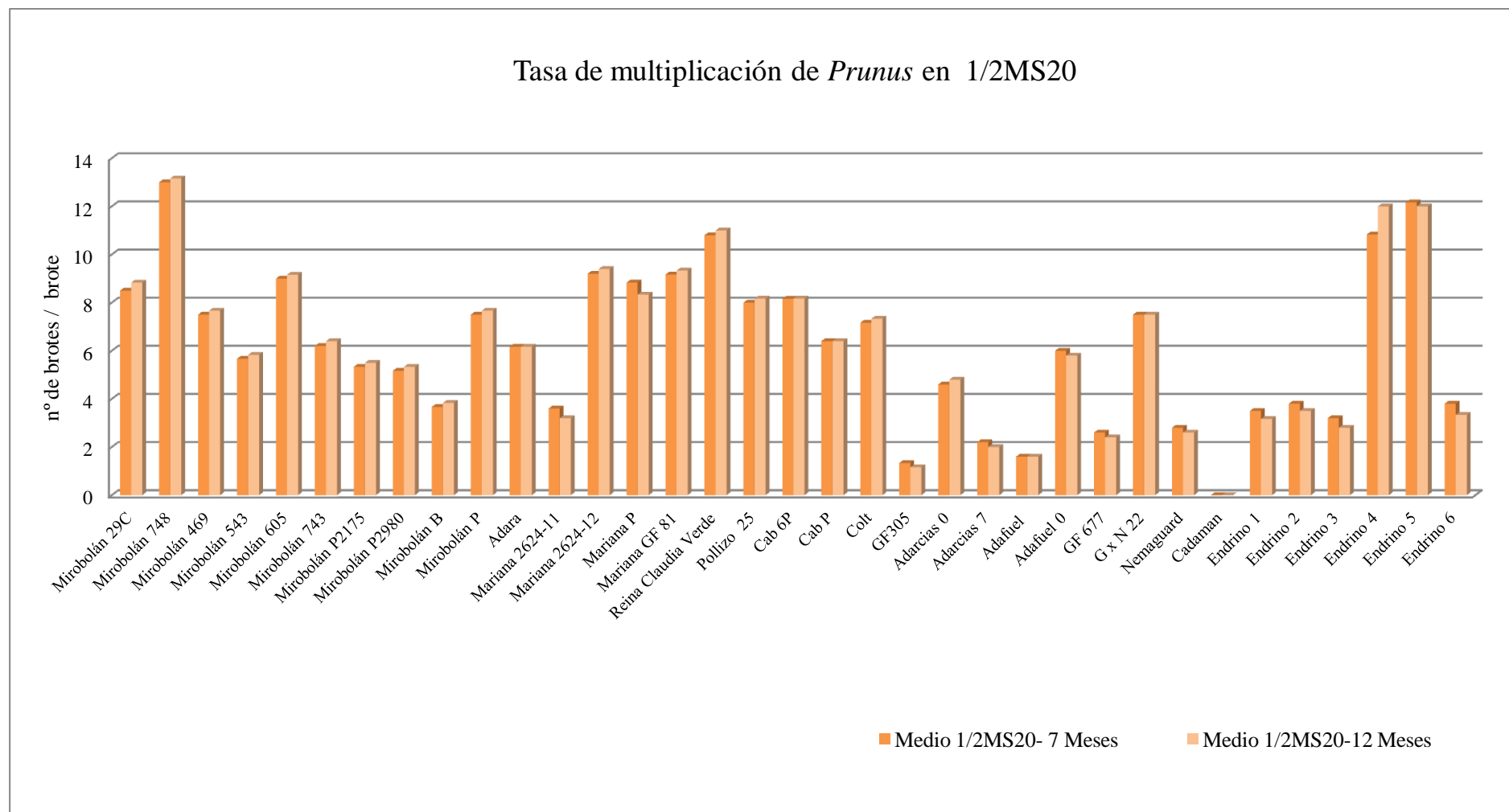


Figura 88: Comparación de la tasa de multiplicación del género *Prunus* en el medio de cultivo 1/2MS20 en los periodos de 7 y 12 meses.

Dentro del grupo *P. cerasifera x munsoniana*, los clones Mariana 2624-11 y Mariana P al pasar de 7 a 12 meses presentan un empeoramiento de su aspecto y se reduce su tasa de multiplicación ya que, algunos brotes se vuelven marrones y mueren (Figura 89). Sin embargo en los clones Mariana 2624-12 y Mariana GF 81 la tasa de multiplicación obtenida mejora en un 2% cuando pasamos de 7 a 12 meses de cultivo y mantienen un buen aspecto.



Figura 89: Clon Mariana 2624-11 (*Prunus cerasifera x munsoniana*) después de 12 meses de cultivo en el medio 1/2MS20 (Tratamiento 4).

Dentro del grupo de los ciruelos el clon Reina Claudia Verde y un clon de *Prunus insititia* (Pollizo de Murcia 25) no varían su tasa de multiplicación con el incremento de tiempo.

En el grupo cerezo el clon Colt multiplica algo más tras un periodo de 12 meses con buen aspecto (un 2,5% más), y los 2 clones Cab no varían su tasa de multiplicación aunque su buen aspecto se mantuvo.

Dentro del grupo de melocotonero e híbridos (*P. persica*, *P. amygdalus x persica* y *P. persica x davidiana*) la tasa de multiplicación disminuye en el 55,5% de los clones para 12 meses de conservación y algunos brotes empeoran su aspecto. En el clon GF305, la disminución de la tasa fue del 12,8% y para el clon Adafuel 0 del 3,3%, ya que algunos de los brotes se ponen marrones y mueren (Figura 90). La tasa de multiplicación no varió en 2 de los clones, y sólo Adarcias 0 presento un aumento de la tasa de multiplicación al aumentar el periodo de tiempo en cultivo ralentizado.

En *P. spinosa* los clones tras 12 meses de permanencia en cultivo ralentizado multiplicaban por debajo de 5 brotes, disminuyendo un 66,6% frente a 7 meses de cultivo y además el aspecto de los brotes cambió a color pardo (Figura 91).



Figura 90: GF 305 (*Prunus persica*) en el medio 1/2MS20 después de 12 meses en el Tratamiento 4.



Figura 91: Clon Endrino 2 (*Prunus spinosa*) en el medio 1/2MS20 después de 12 meses en Tratamiento 4.

En los 77 clones de *P. cerasifera x armeniaca* al aumentar el tiempo de cultivo en condiciones de crecimiento lento en el medio 1/2MS20, los brotes sufren deterioro y muerte por lo que su tasa de multiplicación disminuye en el 28,5% de los clones. Sin embargo, no presenta cambios en las frecuencias de las tasas de multiplicación >5 o <5 , manteniéndose los clones en los mismos grupos, por lo que no hay diferencias en el grado de asociación de las variables.

Es decir en el medio de cultivo MS20 no encontramos asociación entre multiplicación y elongación, pero en el medio de cultivo 1/2MS20 el test χ^2 revela que existe una asociación significativa entre la tasa de multiplicación y la elongación de los brotes (Tabla 4 y 11; Figura 83 y 84).

4.8. RECUPERACIÓN DEL MATERIAL

En la gran mayoría de los clones estudiados se ha obtenido el 100% de supervivencia, sin embargo encontramos diferencias en el número de subcultivos necesarios para una recuperación óptima (crecimiento estándar) después de los tratamientos. Los diferentes géneros estudiados presentan diferencias en el número de subcultivos necesarios para un crecimiento activo *in vitro* óptimo, tras los tratamientos de crecimiento ralentizado. En general, consideramos que el número de subcultivos necesarios para la recuperación del material a condiciones de crecimiento activo es de 3 subcultivos (3 meses) (Figura 92 y 93).

La recuperación en el género *Prunus* en 3 subcultivos tiene lugar en un 49,2% de los clones tras un periodo de 7 meses en frío en el medio MS20 y sin embargo, el porcentaje de clones que se recuperan en 3 subcultivos, después de 12 meses en crecimiento lento en medio 1/2MS20, es mucho mayor, un 80,9%.

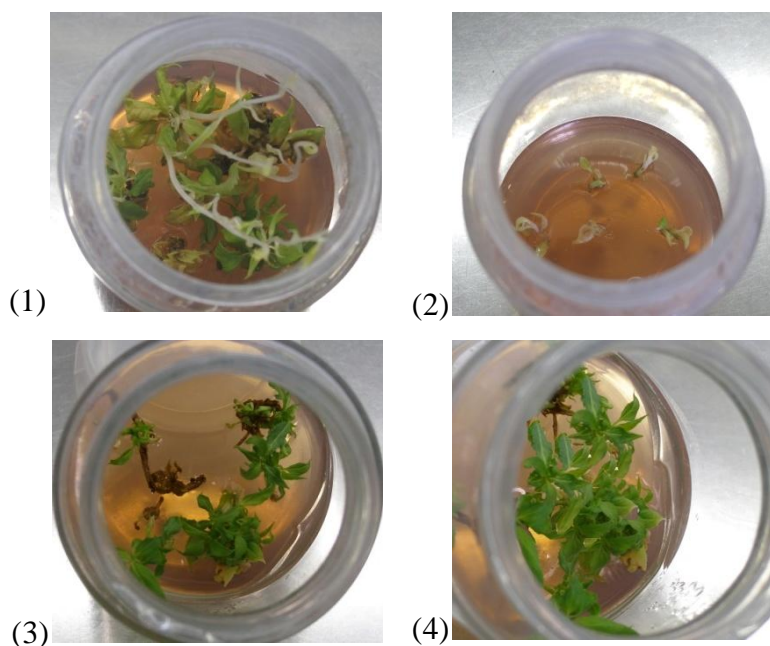


Figura 92: Estados de desarrollo del Mirobolán 605 de la especie *Prunus cerasifera* al salir de la conservación en frío tras el Tratamiento 2 (1), el primer subcultivo (2), segundo subcultivo (3) y tercer subcultivo (4) durante la recuperación.

(1)



(2)



(3)



(4)



Figura 93: Estados de desarrollo del híbrido nº 3 de *Prunus cerasifera x armeniaca* al salir de la conservación en frío tras el Tratamiento 3 (1), el primer subcultivo de estos clones (2), su recuperación en un segundo subcultivo (3) y en el tercer subcultivo (4).

Para el género *Ficus* en el Tratamiento 2 uno de los clones se recupera en 3 subcultivos (50% del material) y el otro clon muere antes de completar el periodo de tratamiento. En el Tratamiento 4 sobreviven los 2 clones pero son necesarios más de 3 subcultivos para su recuperación. En el género *Cydonia* de los 2 clones conservados sólo 1 de ellos se recupera en 3 subcultivos en cada uno de los medios: en el medio MS20 se recupera en tres subcultivos el clon Membrillero BA 29 mientras que en el 1/2MS20 el clon recuperado es el membrillero EM-C. En el género *Eriobotrya* sólo hay recuperación en 3 subcultivos en uno de los medios, el MS20. Lo mismo sucede en el género *Crataegus* con una recuperación del 100% de los clones en 3 subcultivos en el medio 1/2MS20. En los géneros *Malus* y *Pyrus* la recuperación es total en cualquiera de los medios y periodos de estudio (Figura 94).

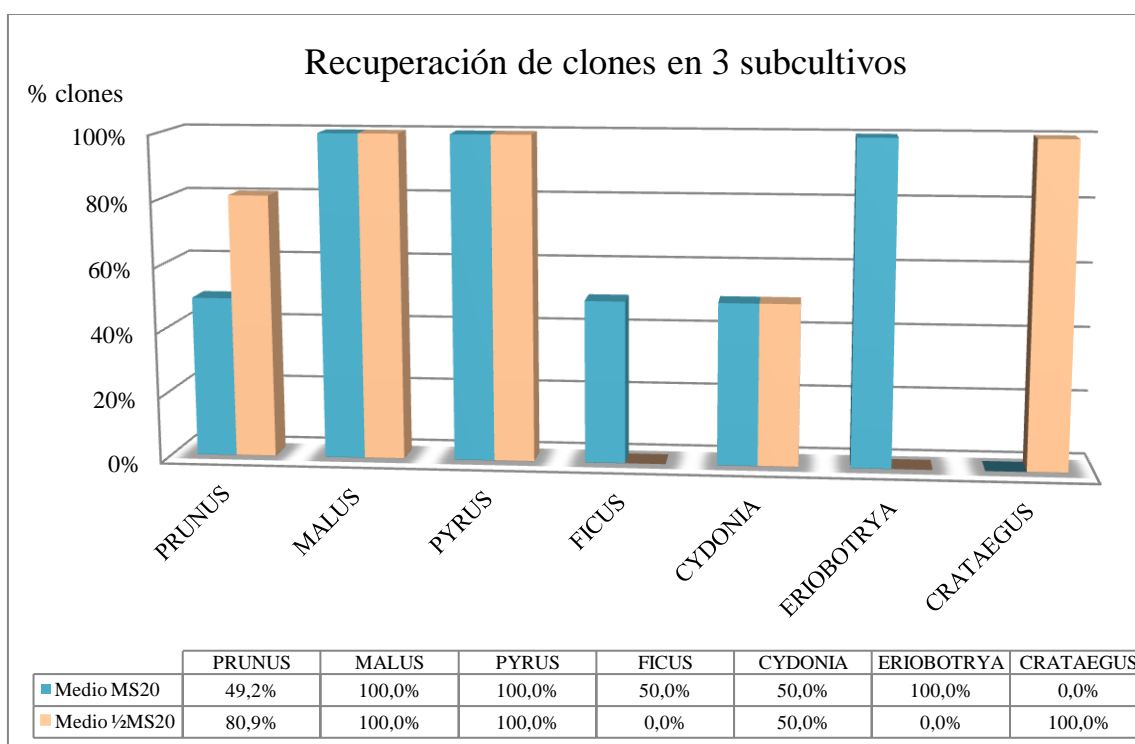


Figura 94: Comparación del porcentaje de clones recuperados y en crecimiento activo tras 3 subcultivos después del cultivo ralentizado en los Tratamientos 2 y 4.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El almacenamiento de germoplasma de frutales en crecimiento lento durante un año, según los resultados de este trabajo, es un método viable para mantener grandes colecciones en poco espacio. Este trabajo ha mostrado que el crecimiento ralentizado permite mantener el material vegetal de una manera eficaz, ya que hemos obtenido una supervivencia del 98,6% de los 138 clones estudiados, desarrollando un protocolo generalizado válido para 136 clones de 17 especies pertenecientes a 7 géneros. Los trabajos publicados trabajan en general con una o dos especies para optimizar protocolos de conservación y únicamente se realizó la conservación de 11 especies frutales en un trabajo de Wilkins y colaboradores (1988) encontrando que el almacenamiento en bajas temperaturas es aplicable para manzano, ciruelo y cerezo pero no para *Punica*, *Morus* o *Actinidia*.

En este trabajo se ha visto además que no solo con la especie, sino siempre que se trabaja con un nuevo clon, debe experimentarse antes para ver su adaptación al frío, medio de cultivo o condiciones de crecimiento ralentizado.

Entre los 138 clones estudiados únicamente dos: Cadaman y granado no sobrevivieron en ninguno de los tratamientos utilizados, muriendo en los 3 primeros meses de conservación a 4°C. Esto nos indica que presentan una falta de adaptación a bajas temperaturas. Wilkins y colaboradores (1988) observaron asimismo sensibilidad al frío en la especie *Punica granatum* a 4°C que se conserva, sin embargo, adecuadamente a 10°C. Los trabajos bibliográficos sobre almacenamiento en frío por encima de 0°C de plantas leñosas y arbustos muestran que la temperatura aplicada oscila entre 1°C (*Malus domestica* y *Pyrus pyriflora*) (Lundergan y Janick, 1979; Moriguchi, 1995) y un máximo de 12°C (*Vitis rupestris* y *V. vinifera*) (Galzy y Compan, 1988). Sin embargo, la aplicación de una temperatura de entre 2 y 5°C es el método más empleado para la conservación en frío en más del 70% de los trabajos (Lambardi y Ozodugro, 2013). Algunas especies tropicales y subtropicales que necesitan una temperatura superior a la estándar de 23°C y son sensibles a bajas temperaturas de cultivo *in vitro* (Engelman, 1991b), se conservan también a temperaturas superiores 14-20°C en crecimiento ralentizado (George, 1993). Para los dos clones no adaptados de nuestro trabajo habría que experimentar en un futuro su conservación en una temperatura superior a 4 °C o la ralentización del crecimiento mediante otros métodos como la adición de inhibidores hormonales o de agentes osmóticos (Withers *et al.*, 1990).

EFECTO LUZ/OSCURIDAD

La presencia de luz blanca con un sistema de iluminación LED de 3 vatios (110-150 lm) durante 24 h en la cámara de conservación del material a 4°C provocó la muerte prematura del material. Los cultivos mueren presentando ennegrecimiento de sus tejidos en un corto periodo de tiempo (2 meses). En especies leñosas, los experimentos en crecimiento lento suelen hacerse en oscuridad (Negri *et al.*, 2000; Bekheet *et al.*, 2002; Ozden-Tokalti, 2011; Lambardui y Ozudogu, 2013), aunque algunas combinaciones de fotoperiodo e intensidad de luz han dado buenos resultados en algunas especies de *Prunus* (Marino *et al.*, 1985), *Castanea* (Capuana y Di Lonardo, 2013), o *Malus* (Hao, 2003). En otras especies leñosas, los cultivares de pistacho "Uzun" y "Kirmizi" fueron mantenidos a 4°C también en oscuridad durante 6 meses, o los cultivares "Atli" y "Siirt" se mantuvieron a 4°C en la oscuridad durante 3, 6, 9 y 12 meses (Özden-Tokatli *et al.*, 2011).

Sin embargo, la luz era beneficiosa para la conservación de brotes transgénicos de peral a 4°C durante 12 meses, con un fotoperiodo de 12 h (Hao *et al.*, 2004) y un fotoperiodo de 16 h mantuvo también los cultivos tanto en granado (Wilkins *et al.*, 1988) como en *Camellia japonica* (Ballester *et al.*, 1997). En nuestros ensayos la luz continua no resultó adecuada para la conservación de ninguno de los clones estudiados.

EFECTO MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo no ha sido determinante para la supervivencia de los clones en nuestros experimentos, sin embargo, el medio de cultivo ha sido determinante para la multiplicación y elongación de los brotes y esto influye en la duración del periodo de recuperación. En general, el medio de cultivo más adecuado para nuestros clones ha sido el que tiene la mitad de macronutrientes del MS y 20 g de sacarosa, mostrando un efecto beneficioso la menor concentración de sales minerales y de sacarosa, ambos con un efecto osmótico añadido al nutritivo.

Cambios en el contenido de carbohidratos, nutrientes inorgánicos, el potencial osmótico o los reguladores de crecimiento del medio de cultivo se usan en numerosas

especies para inducir el crecimiento ralentizado y mejorar la conservación en estas condiciones (Engelman, 1991b; Engelman, 2011; George, 1993).

Aunque la mayoría de los trabajos de conservación de especies leñosas se han realizado usando el medio estándar MS (Murashige y Skoog, 1962), hay autores que utilizan el medio "woody plant medium" WP (Lloyd y McCown, 1980), por ejemplo en *Castanea* (Capuana y Di Lonardo, 2013) con buenos resultados de supervivencia, 56% en 12 meses, o el medio QL (Quoirin y Lepoivre, 1997) sin hormonas utilizado en *Sequoia sempervirens* (Ozudogru *et al.*, 2012) con resultados óptimos del 90% de supervivencia después de 12 meses. En nuestro caso se trataba de encontrar un medio adecuado para el mayor número posible de especies y clones a fin de facilitar el trabajo de mantenimiento del material. El medio se basó en modificaciones en el medio MS ya que era el medio empleado para cultivar *in vitro* la mayoría de los clones en estudio. Las modificaciones principales en este medio de cultivo han sido la reducción en los macronutrientes y la reducción en la concentración de sacarosa para inducir una menor tasa de crecimiento en los cultivos durante su conservación.

La reducción a la mitad en las cantidades de macronutrientes se ha utilizado en trabajos con frutales en *Pyrus*. Ahmed (2010) encuentra el medio 1/2MS el idóneo para 9 genotipos, con una supervivencia del 63%, aunque los resultados son variables dependiendo del genotipo. Asimismo, una concentración a la mitad de las sales minerales fue empleada en manzano (Negri *et al.*, 2000) y sin embargo, la misma concentración de micronutrientes que el medio MS fue empleada para la conservación de diversas especies de patrones de *Prunus* (Marino *et al.*, 1985).

En otras especies la reducción de sales minerales también fue efectiva en la conservación del material. Las plántulas de café 'arabica' se pudieron preservar durante 2 años en un medio desprovisto de azúcar y con sólo la mitad de las sales minerales del medio estándar (Kantha *et al.*, 1981). También la especie tropical *Pasiflora suberosa* utilizada como ornamental creció en condiciones ralentizadas durante 12 meses con medios con la mitad o 1/4 de sales de MS (García *et al.*, 2011).

La concentración de sacarosa se redujo para la conservación del material induciendo junto con las bajas temperaturas el ralentizamiento del crecimiento. Una reducción de la sacarosa a 20 g/l (33% menos que la concentración habitual), como la empleada en nuestras condiciones, se ha utilizado con buenos resultados en *Prunus*, con un 100% de supervivencia a los 6 meses de cultivo (Marino *et al.*, 1985) así como en

otras especies frutales como peral (Hao y Deng, 2005) o manzano (Hao y Deng, 2003; Negri *et al.*, 2000).

Sin embargo, los cultivos de brotes del portainjertos de cerezo ('Gisela 5 ®'), el patrón de manzano ('M26') y el portainjertos de peral ('A74'), almacenados a 4°C en oscuridad con tres concentraciones de sacarosa diferentes (10, 20 y 30 g por litro) obtuvieron los mejores resultados con 30 g de sacarosa (Lambardi *et al.*, 2006). Esto nos indica que podríamos tener en cuenta esta referencia en frutales para futuros estudios. En otros trabajos con los cultivares de guindo 'Dolgozdannaya', 'Moya Radost' y 'Zukovskaya' se comparó la utilización de sacarosa, manitol en diferentes concentraciones, o sacarosa con adicción de ácido abscísico. La sacarosa al 3 % fue la mejor fuente de carbono para estos cultivares en medio MS sin reguladores de crecimiento manteniéndose en buen estado durante 30 meses a 4°C, mejor que 2 ó 3 % de manitol y que la combinación de 2% de manitol y sacarosa al 2% o la adición de ácido abscísico a 3% de sacarosa en medio MS que disminuyó significativamente la duración de almacenamiento (Kovalchuk, *et al.*, 2011).

En nuestro caso manteniendo el 2% de sacarosa y reduciendo a la mitad las sales minerales conseguimos un medio generalizado para el mantenimiento en crecimiento lento durante 12 meses para 136 clones diferentes (98,6%).

Además, el medio de cultivo ha sido determinante para la multiplicación y la elongación de los brotes en cultivo en este trabajo y esto influye para conseguir un periodo corto de recuperación. Respecto a la tasa de multiplicación, se observa que el medio 1/2MS20 mejora la tasa de multiplicación en los clones de todos los géneros excepto para Higuera S4 y más específicamente dentro del género *Prunus* el 31,4% de los clones multiplica más en el medio de cultivo 1/2MS20 frente al 20% que lo hace en el medio de cultivo MS20. Respecto a la elongación es interesante resaltar que el medio de cultivo tuvo un efecto en la elongación de los brotes ya que hay clones que elongan únicamente en uno de los medios de cultivo. En los clones *Prunus cerasifera x armeniaca* el medio de cultivo 1/2MS20 tuvo un efecto positivo en el crecimiento. Además muestra una asociación entre la tasa de multiplicación y la elongación, de manera que cuando multiplican poco, elongan poco, probablemente debido a una falta de crecimiento general.

Se ha encontrado una relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio nutritivo, que puede tener efectos sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos *in vitro* (Staritsky, 1980). Por otra

parte, la reducción de sales minerales y azúcar en el medio induce reducción de crecimiento, ya que el balance de sales y correcta concentración son uno de los componentes más determinantes del medio de cultivo y el aporte de azúcares como fuente de energía es decisivo en el cultivo *in vitro* donde la planta crece de modo heterotrófico (George, 1993). En nuestro trabajo hemos reducido tanto la concentración de carbohidratos como la de las sales minerales, pero no a niveles que afecten ese crecimiento en condiciones de baja temperatura y nuestros resultados están de acuerdo con los efectos ya descritos.

El material que en crecimiento activo presenta una tasa de multiplicación menor que otros cultivos, mantiene esta característica en condiciones de crecimiento ralentizado. Teniendo en cuenta la variabilidad de material y el alto número de clones con los que se ha trabajado, es un buen resultado. Un ejemplo sería el género *Eriobotrya* difícil de mantener en cultivo estándar o activo y en crecimiento lento sucede lo mismo.

EFECTO TIEMPO

El tiempo es el principal factor en los ensayos de conservación de germoplasma, ya que en realidad se busca el mantener el material el mayor tiempo posible sin subcultivos, de forma que evitemos tanto mano de obra como el riesgo de subcultivos frecuentes del material.

En este trabajo se han mantenido los cultivos durante un año en condiciones de crecimiento ralentizado consiguiéndose la supervivencia del 98,6% de los clones estudiados. El paso de 7 a 12 meses en conservación no produjo efecto en la conservación final de los mismos, aunque sí produjo un cierto decaimiento produciendo la muerte de alguno de los brotes en cultivo. En los brotes transgénicos de peral las hojas basales se vuelven amarillas y después los brotes mueren al aumentar el periodo en cultivo ralentizado en más de 12 meses (Hao *et al.*, 2004).

Capuana y Di Lonardo (2013) mantienen el cultivar Montemarano de *Castanea* a 4°C durante 4 años, pero los subcultivan cada 18 meses para renovar los nutrientes.

Wilkins (1988) que trabaja con un número elevado de leñosas, las mantiene en crecimiento ralentizado con un rango que va de los 9 meses en el caso de *Prunus domestica* cv. Jeffersosns Gage, a los 28 meses de *Malus domestica* cv. M7 y M25. Para

este autor es importante definir un criterio general de supervivencia aplicable a todas las especies así como que el resultado del experimento sería determinar el máximo tiempo de supervivencia del material sin subcultivarlo a un medio nuevo.

En general los cultivos se mantienen entre 9 y 36 meses en conservación en crecimiento ralentizado (Withers, 1992) y en frutales entre 6 y 24 meses (Wilkins, 1988), sin embargo, en especies como *Pinus radiata* se han conseguido el mantenimiento durante 5,5 años con un solo subcultivo (George, 1993).

RECUPERACIÓN DEL MATERIAL

El tiempo de recuperación tras la conservación de plantas en condiciones de crecimiento ralentizado ha de ser lo más breve posible para volver a conservarlos *in vitro* o ser utilizados en nuevos ensayos con el mínimo esfuerzo.

Por ello, se realizó después de los tratamientos el estudio de la recuperación de los brotes en 3 subcultivos sucesivos (incluido el inicial tras concluir del crecimiento ralentizado) para la renovación del material. Una vez transcurridos estos subcultivos el material se encuentra en condiciones óptimas para reintroducir en conservación o utilizar en condiciones de cultivo *in vitro* normal. Esto se ha conseguido de forma general en este trabajo en el medio de cultivo considerado óptimo: 1/2MS20. Pero el resultado varió con el genotipo, sí para *Pyrus* y *Malus* ambos medios son satisfactorios por igual, para los cultivos de *Crataegus* y la mayor parte de los clones de *Prunus* (80,2%) son más satisfactorios con el medio 1/2MS20, mientras que los de *Eriobotrya* y *Ficus lo son* con el medio MS20. En *Cydonia* el medio satisfactorio dependió del clon. Los cultivos de *Punica* no pudieron ser recuperados.

Según Lambardi y Ozudogru (2013) cuando se trasladan las plantas de nuevo al medio de cultivo estándar en las condiciones anteriores al crecimiento lento, éstas deben ser capaces de volver a crecer rápidamente y reanudar su tasa de proliferación inicial en 1-2 subcultivos más el subcultivo inicial, que son las condiciones conseguidas para nuestros cultivos. Wilkins (1988) también habla de la importancia de la buena recuperación del material como un factor importante a la hora de encontrar el medio adecuado de crecimiento lento. Distingue entre material vivo y viable, ya que viable significaría que el material tiene capacidad para crecer y desarrollarse en posteriores

subcultivos, es decir, el material con ápices sanos capaces de iniciar un nuevo crecimiento organizado al ser transferido a un medio de cultivo nuevo. Después del crecimiento ralentizado los tejidos pueden presentar problemas de vitrificación o baja recuperación según el tratamiento (Withers, 1992). La vitrificación o hiperhidricidad se ha observado en varias especies pero puede paliarse reduciendo la concentración de citoquinina en el medio de cultivo (Negri *et al.*, 2000). En nuestro caso se ha utilizado el "bottom cooling" para paliar la vitrificación en los pocos clones que la presentaron, con buenos resultados sin necesidad de otro factor para reducirla.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El crecimiento ralentizado es un método factible para el almacenamiento de germoplasma de frutales *in vitro* para el mantenimiento de grandes colecciones en un espacio reducido. Permite mantener el material vegetal de una manera eficaz, obteniendo en este proyecto una supervivencia del 98,6% de los 138 clones estudiados.

2. Es posible realizar la conservación *in vitro* del material con un protocolo general. En este trabajo se ha desarrollado un protocolo generalizado válido para 136 clones de 17 especies diferentes pertenecientes a 7 géneros, manteniendo los cultivos a 4°C en oscuridad con un medio basado en el medio MS, con la mitad de sus sales y un 2% de sacarosa.

3. El efecto del genotipo es importante. En este estudio dos clones, granado y Cadaman, no sobrevivieron a ninguno de los tratamientos, probablemente debido a su poca adaptación a bajas temperaturas.

4. La iluminación tiene influencia en la conservación *in vitro*. La presencia de luz continua en la conservación del material en crecimiento lento a 4°C provocó la muerte prematura del material.

5. La composición y concentración de sales de los medios de cultivo han tenido un gran efecto en la optimización del protocolo. Aunque entre los medios de cultivo utilizados no hay uno determinante para la supervivencia de los clones, influyen en la multiplicación y elongación de los brotes.

6. Se ha optimizado un medio para nuestras condiciones y la mayoría de nuestros genotipos. El medio 1/2MS20 mejora la tasa de multiplicación en los clones de todos los géneros excepto para Higuera S4.

7. La duración del periodo de conservación *in vitro* es un factor importante para el estado de la planta, iniciándose el decaimiento de los cultivos a partir del séptimo mes. Al aumentar el tiempo a 12 meses algunos brotes del cultivo mueren aunque no produce un efecto significativo en el porcentaje de supervivencia final.

8. La velocidad de recuperación del material, al volver a las condiciones estándar del cultivo *in vitro*, está relacionada con el medio de cultivo utilizado en los genotipos estudiados. El medio 1/2MS20 es más adecuado para una recuperación de los cultivos en 3 subcultivos sucesivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, M., Anjum, M. A., Sahah A. H., S., Hamid, A., 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pak. Journal Botany, 42(3): 1639-1650.

Akin-Idowu, P. E., Asiedu, R., Maziya-Dixon, B., Odunola, A., Uwaifo, A., 2009. Effects of two processing methods on some nutrients and anti-nutritional factors in yellow yam (*Dioscorea cayenensis*). African Journal of Food Science, 3(4), 086-093.

Ashmore, S.E., 1997. Status Report On the Development and Application of *In Vitro* Techniques For the Conservation and Use of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

Baraket, G., Chatti, K., Saddoud, O., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M., Salhi-Hannachi, A., 2009. Genetic analysis of Tunisian fig (*Ficus carica* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Scientia Horticulturae, 120:487-492.

Ballester, A., Janeiro, L.V., Vieitez, A.M. 1997. Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. Scientia Horticulturae, 71:67-78.

Bekheet, S. A., Taha, H. S., Saker, M. M., 2002. *In vitro* long-term storage of date palm. Biologia plantarum, 45(1), 121-124.

Bertrand, A., Noirot, M., Charrier, A., 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 105-110.

Bhat, S.R., Chandel, R., 1993. *In vitro* conservation of *Musa* germplasm: effects of manitol and temperature on growth and storage. Journal of Horticultural Science 68: 841-845.

Blanco, E., Casado, M.A., Costa, M., Escribano, R., García-Antón, M., Génova, M., Gómez-Manzanegue, A., Gómez-Manzanegue, F., Moreno, J.C., Morla, C., Regato, P., Sainz-Ollero, H., 1997. Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica. Ed. Planeta, Barcelona.

Blumenfeld, A., Shaya, F., Hillel, R., 2000. Cultivation of pomegranate. Options Méditerranéennes Ser. A, 42: 143- 147.

Boudabous, M., Ben Marzouk, I., Marzougui, N., Lechiheb, B., Ben Yahia, L., Ferchichi, A., 2013. Physicochemical characterization of the local apple cultivar 'Douce D'jerba' compared with introduced cultivars in Tunisia. *Acta Horticulturae (ISHS)* 997:117-128

Breton, S., Jeandet, C., Mesnil, G., Trillot, M., Vidaud, J., Viard, M.P., Fourel, M.A., 1972. *Le Cerisier*, Monographies de l'Invuflec. Institut National de Vulgarisation pour les fruits, légumes et champignons. Paris, France, p. 235.

Caccavale, A., Lambarri, M., Fabbri, A., 2005. Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplar. (ISHS). *Acta Horticulturae* 457: Symposium on Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Londs.

Cambra, R., Cambra, M., 1972. Selección clonal del ciruelo Mirobolán. (*Prunus Cerasifera* E.H.R.H.) Resumen de trabajos durante el periodo 1950-71. Trabajo mecanografiado. 192pp.

Cambra, R., Cambra, M., 1973. Selección clonal del ciruelo Mirobolán. (*Prunus Cerasifera* E.H.R.H.) Compatibilidad con variedades del ciruelo de la E.E. de Aula Dei, 8-16.

Cambra, R., 1979. Selección de híbridos espontáneos de almendro x melocotonero. *ITEA* 10: 49-55.

Cambra, R., 1983. Patrones para albaricoquero, cerezo y ciruelo. Apuntes II Curso Internacional de Fruticultura 2-Nov a 2-Dic. 1983. Zaragoza.

Capuana M., Di Lonardo, S., 2013. *In vitro* conservation of chestnut (*Castanea sativa*) by slow growth. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 49: 605–610.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2007. Multi-Institutional Distance learning course on the ex situ conservation of plant genetic Resources. (En línea). CIAT publication N° 360, palmira, Colombia. 235 p. (Consultado: 18 abril 2013). Disponible: http://www.ciat.cgiar.org./ccc/pdf/Course_Ex_Situ/contents.pdf

Charoensub, R., Phansiri, S., Sakai, A., Yongmenitchai, W., 1999. Cryopreservation of cassava *in vitro* grown shoot tips cooled to -196 °C by vitrification. *Cryo-Letters* 20: 89-94.

Crossa-Raynaud, P., Audergon, J. M., 1987. Apricot rootstocks. In: Rootstocks for Fruit Crops. Rom, R. C. and Carlson, R. F. eds. John Wiley and Sons. New York.

Daorden, M. E., García, M. E., Arbeloa, A., Marín, J. A., 2001. Aplicación de la micropropagación a la obtención de patrones híbridos para albaricoquero. *Actas de Horticultura*, 30, 1343-1346.

Daorden, M. E., 2003. Selección de híbridos interespecíficos para la obtención de nuevos patrones de albaricoquero. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra.

Da Graça M., 2006. Estudio del comportamiento poscosecha de la ciruela 'Reina Claudia Verde'. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura y Universidade de Évora.

Druart, P., 1985. *In vitro* germplasm preservation techniques for fruit trees. p.167-171. In: A. Schafer-Menuhr (ed.), *In Vitro Techniques. Propagation and Long Term Storage*. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

Dussert, S., Couturon, E., Bertrand, B., Joet, T., Engelmann, F., 2011. Progress in the implementation of the French Coffee Cryobank. *In Abst. COST Action 871 "Cryopreservation of crop species in Europe" Final Meeting (Angers, FR)*.

Engelmann, F., 1991a. *In vitro* conservation of horticultural species. *Acta Horticulturae* 298: 327-334.

Engelmann, F., 1991b. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica* 57: 227-243.

Engelmann, F., 1997. *In vitro* conservation methods. In: Callow JA, Ford-Lloyd BV & Newbury HJ (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources* (pp 119-161). CABI, Oxon.

Engelmann, F., Takagi, H., 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma.

Engelmann, F., 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev. Biology- Plant* 47: 5-16

Esmenjaud, D., Scotto la Massese, C., Saleuses, G., Minot, J.C., Voisin, R., 1992. Method and criteria to evaluate resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Prunus cerasifera* Ehr. *Fundam. Appl. Nematol.* 15: 385-389.

Fahy G.M., Meryman H.T., Angell C.A., 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426.

Felipe, A. J., 1989. Patrones para frutales de pepita y hueso. Ed. Técnicas Europeas.

Felipe, A.J., Gómez Aparisi, J., Socias i Company, R., Carrera, M. (1997). The alond x peach hybrid rootstocks breeding program at Zaragoza (Spain). *Acta Horticulturae* 451 (1): 259-262.

Fernández, M., Alejano R., 2011. Producción y manejo de semillas y plantas forestales. Tomo II: *Prunus spinosa* L. Organismo Autonomo de Parques Nacionales. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Eds: J. Pemán, R. M. Navarro, J. L. Nicolás, M. A. Prada, R. Serrada, pp 158-165.

Food and Agriculture Organization (FAO), 2005. The global strategy for plant conservation. commission on genetic resources for food and agriculture. Working group on plant genetic resources for food and agriculture (En línea). Third Session, Rome. (consultado en 17 abril. 2014). Disponible en:

<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPS/PGR/ITW/G3RD/pdf/p3i3E.pdf>

Food and Agriculture Organization (FAO), 2013. Normas para el cultivo *in vitro* y el almacenamiento en crecimiento lento. Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. pp: 134-138. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma.

Galzy, R., Compan, D., 1988. Growth and nutrition of grapevine during *in vitro* longterm storage. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13:229-237.

García, L., Pérez, J., Rodríguez, M., Pérez, B., Martínez, Y., Sarriá, Z., 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. Biotecnología Vegetal 4(2): 101-105.

García, R. O., Pacheco, G., Vianna, M. G., Mansur, E., 2011. *In vitro* conservation of *passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation. Cryoletters 32 (5): 377-388.

George, E.F., 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Ed: Exegenetics Limited, England. pp: 163-182.

Gil, M., Pérez, F., Cortés, J., Serradilla, M. J., López Corrales, M., 2009. Caracterización de variedades de higuera cultivadas en Extremadura. Actas de Horticultura, 54: 131-134.

González, MT., Ravelo, MM., Urra, C., Martínez, ME., Engelmann, F., 1998. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apexes. Cryo-Letters 19: 375-382.

Graudal, L., Kjaer E., Thomden N., Larsen A.B., 1997. Planning national programmes of forest genetic resources. Technical Note N° 48. Danida Forest Seed Centre.

Grout, B.W.W., 1995. Introduction to the *in vitro* preservation of plant cells, tissue and organs. p.1-20. In: B.W.W. Grout (ed), Genetic Preservation of Plant Cells *In vitro*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.

Hao, Y-J., Deng, X-X., 2003. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 253–260.

Hao, Y-J., Deng, X-X., 2005. Stable maintenance and expression of a foreign gene in transgenic pear shoots retrieved from *in vitro* conservation. *Journal of Plant Physiology* 162: 237—243.

Herrero, J., 1964. Cartografía de frutales de hueso y pepita. Departamento de Pomología de la Estación Experimental de Aula Dei, C.S.I.C., Zaragoza. Spain.

Hirai, D., Sakai A., 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Report* 21(10): 961-966.

Hor, Y.L., Kim, Y.J., Ugap, A., Chabrillange, N., Sinniah, U.R., Engelmann, F., Dussert, S., 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: *Citrus* as a case study. *Annals of Botany* 95(7):1153-1161.

Jaramillo, S., Baena, M., 2000. Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Material de Apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de Recursos Fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IpgRI). Grupo Américas. 102 p.

Jones, O.P., 1979. Propagation *in vitro* of apple trees and other woody fruit plants. Methods and Applications. *Scientia Horticulturae*, 30: 44-48.

Kartha, K. K., Leung, N. L., Mroginski, L. A., 1982. *In vitro* Growth Responses and Plant Regeneration from Cryopreserved Meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 107(2), 133-140.

Kester, D.E., Grasselly, C.H., 1983. Almond rootstocks. En: Rootstocks for fruit crops. Ro, R. C. y Carlson, E. F. Eds. John Wiley and Sons, New York: 265-293.

Kislev, E. M., Hartman, M. R. and Bar-Yosef , O., 2006. Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science*, 312: 1372-1374.

Kovalchuk, I., Nasibulina, A., Reed, B.M., 2011. *In Vitro* Cold-Storage Duration of Cherry Shoots Is Affected by Carbon Source and Nitrogen Concentration. *Plant Genetic Resources* Ed.: K.E. Hummer. *Acta Horticulturae* 918.

Langis, R., Schnabel, B., Earle, E.D., Steponkus P.L., 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *Cryo-Letters* 10: 421-428.

Langis, R., Steponkus, P.L., 1991. Vitrification of isolated rye protoplasts: Protection against dehydration injury by ethylene glycol. *Cryo-Letters* 12: 107-112.

Lambardi, M., Fabbri, A., Caccavale, A., 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot tips. *Plant Cell Report* 19: 213-218.

Lambardi M., De Carlo A., Roncasaglia R., Dradi G., Previati A., Da Re F., Calamai L., 2006. *In Vitro* Slow Growth Storage of Fruit Rootstocks inside Gas-Tight or Gas-Permeable Containers. *In Vitro Culture and Hort. Breeding. Acta Horticulturae* 725, ISHS 2006.

Lambardi, M., Ozudogru, E.A., 2013. Advances in the Safe Storage of Micropropagated Woody Plants at Low Temperature. *Acta Horticulturae* 988: 29-42.

Linsmaier, E. M., Skoog, F., 1965. Organic growth requirements of tobacco vulgaris L. *Plant Physiology* 52: 554-560.

Linsmaier, E. M., Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 18(1), 100-127.

López Corrales, M., Gella, R. Marín, J. A., 1996. Aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* en el saneamiento de variedades de higuera. *Información Técnica Economica Agraria*, 17: 246-250.

Lundergan, C., Janick, J., 1979. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. *Hortscience*, 14:514.

Lloyd G., McCown B., 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *Hortscience*, 15: 416.

Marín, J.A., 1983. Micropropagación *in vitro* de frutales. II curso Internacional de especialización en Fruticultura. Frutales de hueso (*Prunus*). Capítulo 34.

Marín, J.A., 1993. Micropropagación de especies frutales. *Hortofruticultura* 1:56-62.

Marino, G., Rosati, P., Sagrati, F., 1985. Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5:73-78.

Martinez-Calvo, J., Badenes, M. L., Llácer, G., 2000. Descripción de variedades de Níspero Japonés. Serie Dibulgació Técnica nº 46. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Mlot, C., 1989. Blueprint for conserving plant diversity. How to maximize genetic diversity among rare and endangered plants. *BioScience*, 39(6), 364-368.

Moreno, M.A., Cambra, R., 1994. Adarcias: an almond x peach hybrid rootstock. Hortscience, 29(8):925.

Moreno, M.A., Tabuenca, M.C., Cambra, R., 1994. Performance of Adafuel and Adarcias as peach rootstock. Hortscience, 29(11):1271-1273.

Moreno, M.A., Montañés, L., Tabuenca, M.C., Cambra, R., 1996. The performance of 'Adara' as a cherry rootstock. Science Horticulturae, 65: 85-91.

Moriguchi, T., Kozaki, I., Matsuta, N., Yamak, S., 1988. Plant regeneration from grape callus stored under a combination of low temperature and silicone treatment. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5: 67-71.

Moriguchi, T., Kozaki, I., Yamaki, S., Sanada, T., 1990. Low temperature storage of pear shoots *in vitro*. Bulletin . Fruit Tree Res. Stn. 17: 11-18

Moriguchi, T. 1995. Cryopreservation and minimum growth storage of pear (*Pyrus* species). In: Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 32. p.114-128. Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-479.

Negri, V., Tosti N., Standardi A., 2000. Slow-growth storage of single node shoots of apple genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62: 159-162.

Nodarse, O., Santana, I., Cornides, M.T., Figueredo, Y., Héctor, E., Rodríguez, R., 1998. Comparación de probaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana.

Oka, S., Niino, T., 1997. Long term storage of pear (*Pyrus* spp.) shoot cultures *in vitro* by minimal growth method. JARQ 31: 1-7.

Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, E., 2010. Micropropagación. Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Libro de Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. AgenBio. Eds. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Orlikowska, T., 1992. Effect of *in vitro* storage at 4 8C on survival and proliferation of two apple rootstocks. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31: 1-7.

Ortiz, R., 2000. Conservación de células, tejidos y órganos vegetales a bajas temperaturas: Crioconservación [en línea] 2000. Disponible en:

<http://www.hannover2000.net/expo2000hannover/es/tecnologia/proyectos/crioconservacion/largo.htm>. [Consulta 20 de Septiembre del 2004].

Özden-Tokatli, Y., Akdemir, H., Kaya, E., Tilkat, E., Yildirim, H., Onay, A., 2011. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Turkish Pistachio Germplasm. Proc. Vth IS on Pistachios and Almonds. Eds.: B.E. Ak *et al.* Acta Horticulturae 912.

Ozudogru, E.A., Kaya, E., Kirdo, E., 2011. Development of Protocols for Short-, Medium- and Long-Term Conservation of Thyme. Proc. XXVIIIth IHC – IIIrd IS on Plant Genetic Resources. Ed.: K.E. Hummer. Acta Horticulturae 918.

Ozudogru, E.A., Kirdok, E., Kaya, E., Capuana, M., Benelli, C., 2012. *In Vitro* Conservation of Redwood (*Sequoia sempervirens*) by SlowGrowth Storage and Cryopreservation. Proc. 7th IS on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. Ed.: D. Geelen. Acta Horticulturae 961.

Pannović, S., Jašić, K., Mratinić, E., Nikolić, M., Ogašanović, D., Ognianov, V., Stanisavljević, M., Radoš, L., Radulović, M., 1996. Banka gena vočka jugoslavije 172 genetički resursi i mogućnost konzervacije germplazme vočaka Ref 10 kongr vočara Jugosl., čak Jugosloven vocar. 30:39-50.

Pence, V. C., 2011. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. Kew Bulletin, 65(4), 539-547.

Pennycooke, J.C., Towill, L.E., 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato by vitrification. Plant Cell Report 19: 733-737.

Perry, R.L., 1987. Cherry rootstocks. pp. 217-264, in R.C. Rom and R.F. Carlson (eds.) Rootstocks for Fruit Crops. John Wiley & Sons, New York, U.S.A.

Pierik, R.L.M., 1975. Plantenteelt in Kweekbuzen. Viene, Zutphen, Países Bajos, 1-164.

Pierik, R.L.M., 1990. Cultivo *In Vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

Quatrano, R. S., 1968. Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. Plant Physiology, 43(12), 2057.

Quoirin, M., Lepoivre, P., 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus*. Acta Horticulturae., 78: 437-422.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Reed, B.M., 1999. *In vitro* conservation of temperate tree fruit and nut crops. p.139-153. In: E.E. Benson (ed.), Plant Conservation Biotechnology. Taylor&Francis, London.

Roca, W.M., Escobar, R., Mafla, G., 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali.

Rubio, M.J., 1993. Estudio de las posibilidades de hibridación en el género *Prunus* L. para la mejora genética de patrones. Tesis doctoral. Universidad de Lleida.

Ruiz de la Torre J., 2006. Flora Mayor. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Dirección General para la Biodiversidad, Madrid. pp. 890-893.

Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I., 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Report 9: 30-33.

Sallabanks, R., 1992. Fruit fate, frugivory, and fruit characteristics: a study of the hawthorn, *Crataegus monogyna* (Rosaceae). Oecologia, 91(2), 296-304.

Scocchi, A., Rey, H., 2010. Conservación de germoplasma *in vitro*. Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Libro de Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. AgenBio. Eds. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Scotto la Massese, C., Esmenjaud, D., Minot, J.C., Voisin, R., 1991. Host suitability in the genus *Prunus* to *Meloidogyne arenaria*, particularly clones and intraspecific hybrids of P. Cerasifera. Acta Horticulturae 283: 275-284.

Shen, D., 1992. Fruit Tree Breeding. In: Fruit Tree Breeding (pp8-48). China Agricultural Press, Beijing.

Smith, M. K., 1986. Plant propagator, In: Bajaj, 274-291.

Staritsky, G., Hasselt, G. V., Association Scientifique Internationale du Café, París (Francia), 1980. The synchronised mass propagation of *Coffea canephora* *in vitro*. [Rapport]. In 9. Colloque Scientifique International sur le Cafe. Londres (RU). 1980.

Theilade, I., Port, L., Engels, J., 2004. *Ex situ* conservation through storage and use. In FAO (Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura, IT), FLD (Forest & Landscape Denmark), IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Fitogeneticos, IT). Forest genetic resources conservation and management. Vol. 3: *In plantations and genebanks (ex situ)*. Roma, IT, IPGRI. p. 47-60.

Towill, L.E., 1996. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Tsukazaki, H., Mii, M., Tokuhara, K., Ishikawa, K., 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. Plant Cell Report 19: 1160-1164.

Turner, S.R., Senaratna, T., Bunn, E., Tan, B., Dixon, K.W., Touchell, D.H., 2001. Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. Annals of Botany 87: 371-378.

Uragami, A., Sakai, A., Nagai, M., Takahashi, T., 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. Plant Cell Report 8: 418-421.

Van Der Salm, T. P. M., Van Der Toorn, C. J. G., Hänisch Cate, C. H., Dubois, L. A. M., De Vries, D. P., Dons, H. J. M., 1994. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Money way'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37: 73-77.

Van Den Houwe, I., De Smet, K., du Monteel, H.T., Swennen, R., 1995. Variability in storage potential of banana shoot cultures under medium term storage conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 42: 269-274.

Villalobos, A. V. M., García, V. A., 1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus Caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos. Agrociencia, 48: 107-118.

Wang, Y.L., Fan, M.J., Liaw, S.I., 2004. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. Botanical Bulletin of Academia Sínica (46): 29-34.

Westwood, N.H., 1982. Fruticultura de zonas templadas. Ed. Mundi-Prensa: pp462.

Wilkins, C.P., Newbury, H.J., Dodds, J.H., 1988. Tissue culture conservation of fruit trees. FAO/IBPGR Plant Gen. Res. Newsl. 73/74:9-20.

Withers, L. A., Wheelans, S. K., Williams, J.T., 1990. *In vitro* conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. Euphytica 45: 9-22.

Withers, L. A., 1992. *In Vitro* conservation. In: F. A. Hammerschlag & R. E. Litz (Eds.). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Wallingford: CAB International.

Zhang, H.Z., Peng, S.A., Cai, L.H., Fang, D.Q., 1993. The germplasm resources of the genus *Eriobotrya* with special reference on the origin of *E. japonica* Lindl. Plant Breeding Abstracts, 63: 772.